



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Expresión de genes de *M. tuberculosis* relacionados con el control del ciclo celular  
en la tuberculosis experimental

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.F.B. AXEL CERVANTES SANCHEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. Rogelio Hernández Pando  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Dra. Yolanda López Vidal  
Facultad de Medicina. UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Cervantes Sánchez Axel**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

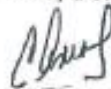
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 07 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Expresión de genes de M. tuberculosis relacionados con el control del ciclo celular en la tuberculosis experimental**", dirigida por el/la Dr(a). **Hernández Pando Rogelio Enrique**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Servín González Luis
VOCAL	Rodríguez Sanoja Romina María de la Paz
VOCAL	Espinosa Gutiérrez Bertha
VOCAL	Raúl Mancilla Jiménez
SECRETARIO	González Pedrajo Bertha María Josefina

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 07 de octubre de 2019.



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**COORDINADORA**

## DEDICATORIAS

A mis papás y hermanas, por su amor, apoyo, paciencia y confianza en todo momento, gracias por todo el amor que me dan.

A Nancy, gracias por estar a mi lado, en las buenas y en las malas, por siempre alentarme, por sacarme de mi zona de confort, por la familia que estamos formando.

A mi pequeña Isabella, por ser ese motorcito que me motiva a superarme y ser mejor cada día.

A la Facultad de Química, mi segunda casa, por todo lo aprendido en tus aulas y laboratorios; por todo lo vivido en tus pasillos.

A la UNAM, mi "alma mater", por ser parte fundamental de mi crecimiento humano y profesional, porque desde el momento que me asignaste mi número de cuenta, siempre has tenido tus puertas abiertas para mí.

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa, por tu apoyo desinteresado.*

*Al Dr. Rogelio Hernández Pando, por haberme permitido formar parte de su laboratorio, por todo el apoyo que siempre me ha dado.*

*A los miembros de mi Jurado, Dr. Luis Servín González, Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo, Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja, Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez y al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, por su tiempo para la revisión de mi tesis, por todos sus comentarios, consejos y correcciones a mi trabajo.*

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue apoyado por: The European Community's Sixth Framework Programme: Contracts No LSHP-CT-2006-037566 (Mycomancy), and LHSP-CT-2005-018923 (NM4TB).

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	9
<b>LISTA DE TABLAS</b>	10
<b>RESUMEN</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>2. MARCO TEORICO</b>	16
2.1 Referencias Históricas.	16
2.2 Situación actual de la tuberculosis	17
2.3 Transmisión	19
2.4 Respuesta inmune a la tuberculosis	21
2.4.1 Respuesta inmune innata	21
2.4.2 Respuesta inmune adaptativa	22
2.4.3 El granuloma	25
2.5 Vacunación	27
2.6 Tratamiento	28
2.7 Agente causal	28
2.7.1 Genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
2.7.2 La familia de proteínas de tipo WhiB	30
2.7.3 WhiA	34
2.7.4 Homólogos de <i>parA</i> ( <i>Rv1708</i> y <i>Rv3213c</i> )	34
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	36
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	36
4.1 Objetivos particulares	36
<b>5. METODOLOGIA</b>	37
5.1 Declaración de Ética	37
5.2 Preparación del inóculo	37
5.3 Infección intra-traqueal	40
5.4 Sacrificio	40
5.5 Análisis histológico y morfométrico	41
5.6 Cuantificación de unidades formadoras de colonias	41

5.7 Extracción de RNA	41
5.8 Síntesis de cDNA.	43
5.9 Integridad del cDNA	44
5.10 Generación de curvas estándar	45
5.11 Expresión de genes por PCR en tiempo real	46
5.12 Análisis estadístico	48
<b>6. RESULTADOS</b>	49
6.1 Expresión de genes micobacterianos	49
6.1.1 En el modelo de infección pulmonar progresiva.	49
6.1.2 En el modelo de infección latente/reactivación	52
6.2 Inmunopatogenicidad de la mutante $\Delta whiB5$ durante la tuberculosis experimental progresiva	55
6.2.1 Determinación de Sobrevida	55
6.2.2 Análisis histopatológico	56
6.2.3 Carga bacteriana en los pulmones (UFC's)	58
6.2.4 Cuantificación de la expresión de citocinas	58
6.3 Inmunopatogenicidad de la mutante $\Delta whiB5$ durante la infección latente/reactivación	60
6.3.1 Determinación de Sobrevida	60
6.3.2 Carga bacteriana en los pulmones (UFC's)	60
6.3.3 Cuantificación de la expresión de citocinas	61
7. Discusión de resultados	63
<b>8. CONCLUSIONES</b>	66
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	67
<b>10. ARTICULO PUBLICADO</b>	

## ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

µL: microlitros

AB: anticuerpos

ADC: Albumina, Dextrosa y Catalasa

ADP: Di fosfato de adenosina

APC's: Células presentadoras de antígeno

ATP: Trifosfato de adenosina

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario

CDS: Secuencias codificadoras de proteínas

CLR's: Receptores de lectina tipo C

CMtb: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

C*whiB5*: Cepa mutante complementada para el gen *whiB5*

DAF: Diacetato de Fluoresceína

DC's: Células Dendríticas

DIEB: Departamento de Investigación Experimental y Bioterio

DNA: Acido desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxinucleosidos trifosfato

DTT: Dithiothreitol

FcR: Receptores de Fc

G3PDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

IFN-γ: Interferón gamma

IL: Interleucina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

MDR: Multi-drogo resistentes

mg: Miligramos

Min: minutos

mL: mililitros

Mø's: Macrófagos



*Mtb: Mycobacterium tuberculosis*

MULV-RT: Enzima retro-transcriptasa de virus de leucoblastoma

NK's: Células asesinas naturales

NLR's: Receptores tipo Nod

OADC: Ácido Oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

ORF: Marcos abiertos de lectura

PBS: Amortiguador salino de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PRR's: Receptores de patrones de reconocimiento

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TB: Tuberculosis

TBA: Tuberculosis activa

TBL: Tuberculosis latente

Th: Células T cooperadoras

TLR's: Receptores tipo Toll

Tm: Temperatura de fusión

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colonias

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

XDR: Extremadamente resistentes

$\Delta whiB5$ : Cepa mutante nula para el gen *whiB5*

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Modelo esquemático de la tendencia de la mortalidad por tuberculosis en Europa occidental de 1740 a 1985.
- **Figura 2.** Informe mundial sobre la tuberculosis 2018 para la región de las Américas
- **Figura 3.** Ciclo de transmisión de la tuberculosis
- **Figura 4.** Inmunidad protectora contra la infección por *Mtb*.
- **Figura 5.** Esquema de la patogénesis de la tuberculosis y los pasos donde los anticuerpos y las células B podrían proporcionar protección contra *Mtb*
- **Figura 6.** Granuloma clásico de TB.
- **Figura 7.** Tipos hipotéticos de granulomas.
- **Figura 8.** Las proteínas WhiB regulan la virulencia de *Mtb*.
- **Figura 9.** Diseño de la placa de trabajo para la PCR en tiempo real.
- **Figura 10.** Cuantificación de la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) durante la TB progresiva
- **Figura 11.** Cuantificación de la expresión de los genes de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1* y *whiB5*) durante la Tb progresiva
- **Figura 12.** Cuantificación de la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) durante la infección latente/reactivación
- **Figura 13.** Cuantificación de la expresión genes de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1* y *whiB5*) durante la infección latente/reactivación.
- **Figura 14.** Sobrevida durante la TB progresiva.
- **Figura 15.** Gráfica de porcentaje de área neumónica durante la TB progresiva.
- **Figura 16.** Gráfica de porcentaje de área neumónica durante la TB progresiva.
- **Figura 17.** Grafica de unidades formadoras de colonias durante la TB progresiva.
- **Figura 18.** Expresión cuantitativa de ARNm durante la TB progresiva.
- **Figura 19.** Patogenicidad de la mutante  $\Delta whiB5$  durante la infección latente con reactivación.
- **Figura 20.** Expresión cuantitativa de mRNA durante infección latente con reactivación

## LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1.** Países con mayor número de casos estimados de TB en las Américas 2017
- **Tabla 2.** Cepas utilizadas en los modelos de tuberculosis progresiva y tuberculosis latente/reactivación.
- **Tabla 3.** Volumen de las soluciones necesarias para la cuantificación de micobacterias
- **Tabla 4.** Mezcla de reactivos para la síntesis de cDNA eucarionte
- **Tabla 5.** Volumen de reactivos para la PCR punto final
- **Tabla 6.** Volumen de reactivos necesarios para la mezcla de reacción en la PCR-RT

## RESUMEN

El grupo de proteínas pertenecientes a la familia WhiB son pequeños reguladores transcripcionales típicos de los actinomicetos. En este trabajo se cuantificó la expresión de cinco diferentes genes micobacterianos: *rv1708*, *rv3213c* y de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1* y *whiB5*) en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c y en un modelo de tuberculosis latente con reactivación en ratones C57/Bl/DBA. Estos genes codifican para proteínas reguladoras de la transcripción que en otras bacterias están relacionadas con la regulación de la esporulación y la diferenciación. Posteriormente se caracterizó el papel de virulencia del gen *whiB5*, que codifica para una proteína de la familia WhiB y que se encuentra dentro del cromosoma *Mycobacterium tuberculosis*. Se evaluó la patogenicidad de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* mutante nula para el gen *whiB5*, incapaz de sintetizar esta proteína, y se demostró que su virulencia se atenuaba durante la infección tanto progresiva como latente en ratones. Incluso, la infección con la mutante se caracterizó por una menor carga bacilar en los pulmones de los ratones infectados y un proceso inflamatorio mayor, lo que sugiere un papel de WhiB5 en la regulación de la respuesta inmune. Interesantemente, la mutante *whiB5* no pudo reanudar su crecimiento durante la reactivación de la infección latente, lo que sugiere que WhiB5 controla la expresión de los genes involucrados en este proceso.

## ABSTRACT

The group of proteins belonging to the WhiB family are small transcriptional regulators typical of actinomycetes. In this work, the expression of five different mycobacterial genes was quantified: *rv1708*, *rv3213c* and the *whi* family (*whiA*, *whiB1* and *whiB5*) in a progressive pulmonary tuberculosis model in Balb/c mice and in a latent tuberculosis/reactivation model in C57/Bl/DBA mice. These genes code for transcriptional regulatory proteins that in other bacteria are related to sporulation regulation and differentiation. Subsequently, the virulence role of the *whiB5* gene was characterized, which encoded for a WhiB family protein and is found within the *Mycobacterium tuberculosis* chromosome. The pathogenicity of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv null mutant for the *whiB5* gene was evaluated, unable to synthesize this protein, and it was shown that its virulence was attenuated during both progressive and latent infection in mice. Even infection with the mutant was characterized by a lower bacillary load in the lungs of infected mice and a major inflammatory process, which suggests a role of WhiB5 in the regulation of the immune response. Interestingly, the *whiB5* mutant could not resume its growth during the reactivation of the latent infection, suggesting that WhiB5 controls the expression of the genes involved in this process.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa y crónica de distribución mundial, producida principalmente por la especie *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1993 declaró la TB como una enfermedad reemergente y de emergencia global. A nivel mundial, es una de las 10 principales causas de muerte y la primera debida a un solo agente infeccioso (WHO, 2018). Millones de personas continúan enfermándose de TB cada año y se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada por *Mtb* y aproximadamente entre el 5 y 10% de esta población desarrollará la enfermedad, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados. La co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la existencia de cepas multi-drogo resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), además de la falta de una vacuna eficaz, hacen necesario el desarrollo de nuevas terapias y métodos de control (WHO, 2018).

Actualmente se han buscado nuevas estrategias para el control de la TB. Entre estas nuevas estrategias se ha trabajado con cepas de *Mtb* mutantes en genes que están relacionados con el control del ciclo celular y su comportamiento en modelos de TB *in vivo*. Siempre se ha asumido que *Mtb* se divide simétricamente, dando lugar a dos células prácticamente iguales. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que el bacilo tuberculoso puede producir ramificaciones, crecer y dividirse asimétricamente (Dahl, 2004). Estas características se parecen a la morfología de otros miembros del orden de los *Actinomycetales*, como *Streptomyces sp.*, una bacteria formadora de esporas que al germinar da lugar a uno o varios tubos germinales que crecen apicalmente y se ramifican formando una hifa (Flärdh & Buttner, 2009).

En este trabajo se evaluó la expresión de cinco diferentes genes micobacterianos (*rv1708*, *rv3213c*, *whiA*, *whiB1* y *whiB5*); además, se evaluó la virulencia e histopatología de una cepa mutante nula para el gen *whiB5* ( $\Delta$ *whiB5*), una cepa complementada para el gen *whiB5* (*CwhiB5*) y una cepa de *Mtb* parental o wild type (*H37Rv*) en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c

y en un modelo de tuberculosis latente con reactivación en ratones C57/BI/DBA. Estos genes codifican para proteínas regulatorias que en otras bacterias están relacionadas con la regulación de la esporulación y la diferenciación (Cole *et al.*, 1998).

Los miembros de la familia Whi son pequeños reguladores transcripcionales que están relacionados con la diferenciación, formación de esporas, la septación y la formación de micelio aéreo en *Streptomyces spp.* cuando se encuentra en condiciones de limitación de nutrientes (Soliveri *et al.*, 2000). *Streptomyces spp.* y *Mtb* están relacionados estrechamente, ambos son actinomicetos con un alto contenido genómico de G + C (58–75%). En el genoma de *Mtb* hay nueve loci *whi*, se cree que las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en la unión al DNA y en la regulación de la transcripción. El importante papel regulador de WhiB en la diferenciación de *Streptomyces spp.* hace que sus homólogos micobacterianos sean candidatos potenciales en la respuesta al estrés o el estado latente de *M. tuberculosis* (Wan *et al.*, 2019).

La segregación de los cromosomas replicados es uno de los procesos biológicos fundamentales de la vida, es un sistema que requiere, como mínimo, un centrómero ubicado en el DNA que va a ser segregado; una nucleótido trifosfatasa (ATPasa), generalmente llamada ParA; y una proteína de unión al centrómero denominada ParB (Zhang & Schumacher, 2017). Los miembros de la familia ParA que están relacionadas con la segregación y con la represión de la esporulación de *Bacillus subtilis* (Sullivan & Maddock, 2000). El genoma de *Mtb* contiene los genes *parA*, *par B* y dos homólogos de *parA*, *Rv1708* y *Rv3213c* (Maloney *et al.*, 2009).

Se ha sugerido que la latencia es una fase específica en la patogénesis de la infección por *Mtb*. Por esta razón durante la infección latente el bacilo de la tuberculosis puede estar ligado a un estado de espora que es transitorio para el crecimiento inicial y para el establecimiento de la infección crónica o persistente que se origina en una fase que se rige por las funciones específicas de los genes del patógeno. El hecho de que los genes necesarios para el establecimiento de la

persistencia parezcan ser similares entre géneros no relacionados filogenéticamente, plantea la interrogante de si las herramientas genéticas se crearon a través de una evolución paralela o convergente (Rhen *et al.*, 2003).



## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Referencias históricas.

Usando datos genéticos, se estima que la especie progenitora de *Mtb* es tan antigua como 3 millones de años, lo que sugiere que nuestros ancestros homínidos más remotos pudieron haber sufrido de TB (Gutiérrez *et al.*, 2005).

En momias egipcias, que datan del 2400 a.C., se han descubierto deformidades esqueléticas típicas de TB. Además en ilustraciones del arte egipcio se observan deformidades de Pott que son características de esta enfermedad. Los primeros documentos escritos que describen a la TB, datan de hace 3300 y 2300 años y se encontraron en la India y en China, respectivamente. También existen documentos hebreos relacionados con la tuberculosis. La antigua palabra hebrea “schachepheth” se usa en los libros Bíblicos de Deuteronomio y Levítico para describir la TB. En el mismo período, en la región andina, las momias peruanas proporcionaron evidencia arqueológica de tuberculosis temprana, incluidas las deformidades de Pott, lo que sugiere que la enfermedad estaba presente incluso antes de la colonización de los primeros pioneros europeos en América del Sur (Barberis *et al.*, 2017).

Para apreciar completamente lo que ha sucedido durante los últimos 100 años, se debe mirar hacia atrás, brevemente, a los siglos precedentes. En la figura 1, se observa que la tuberculosis aumentó dramáticamente en Europa occidental durante los siglos XVII y XVIII y luego comenzó a disminuir. La tasa de mortalidad más alta se observa en el año 1800, un fenómeno indudablemente vinculado a las terribles condiciones socioeconómicas (hacinamiento, mala nutrición, falta de higiene y saneamiento, escasez de atención médica) que prevalecieron durante los primeros años de la revolución industrial. Posteriormente, ocurrió un cambio importante y las tasas de mortalidad comenzaron a caer. No se sabe exactamente por qué, pero existen tres probables explicaciones: i) mejores condiciones socioeconómicas que condujeron, a su vez, a mejorar la nutrición, los estándares de vida y de trabajo; ii) aplicación de medidas primitivas de salud pública; iii) la

comprensión de que la tuberculosis era probablemente una enfermedad infecciosa (Murray, 2004).

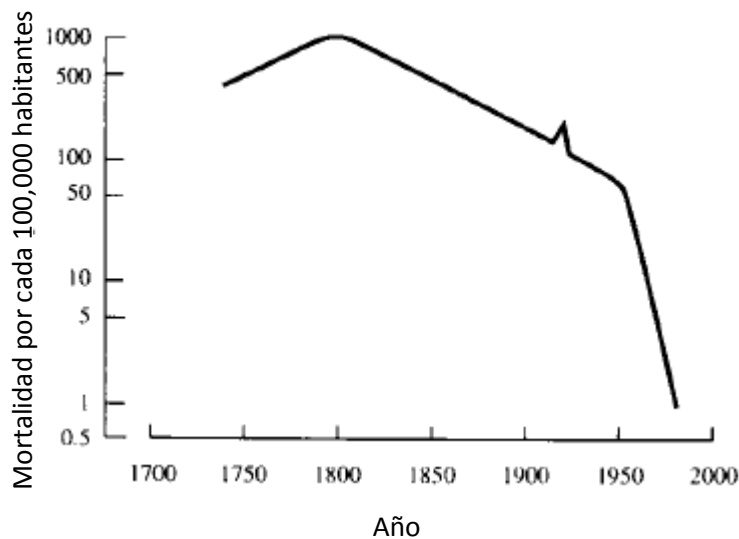


Figura 1. Modelo esquemático de la tendencia de la mortalidad por tuberculosis en Europa occidental de 1740 a 1985. Tomado y modificado de Murray, 2004.

En 1882, el Dr. Roberto Koch aisló y cultivó el bacilo causal de la TB y reprodujo la enfermedad en animales de laboratorio. En décadas posteriores a este descubrimiento, se desarrolló la prueba cutánea de tuberculina por Pirquet y Mantoux (PPD), la vacuna por Albert Calmette y Camille Guérin (BCG), la estreptomycin Selman Waksman y otros medicamentos antituberculosos (Barberis *et al*,2017).

## 2.2 Situación actual de la tuberculosis

Hoy en día, la TB sigue siendo un importante problema de salud pública, por esta razón es necesaria una estrategia combinada, basada en mejorar el tratamiento con medicamentos, los instrumentos de diagnóstico y la estrategia de prevención, para erradicar la tuberculosis a más tardar en el año 2050 (WHO, 2018).

De acuerdo al informe global de tuberculosis 2018 publicado por la OMS, en el año 2017, la tuberculosis causó un estimado de 1.3 millones muertes en personas VIH negativas y adicionalmente 300,000 en personas VIH positivas. Sin embargo,

la proporción de muertes fue menor con respecto al año 2000, 16 % y 23% respectivamente. Mundialmente, se estima que hubo 10 millones de nuevos casos de TB activa, que equivalen a 133 casos por cada 100,000 habitantes. La TB afecta a personas de todo el mundo y de todas las edades, siendo las personas adultas el 90% de todos los casos ( $\geq 15$  años) (WHO, 2018).

Para la región de las Américas, la OPS estimó que en el 2017 hubo 282,000 nuevos casos y recaídas (Figura 2), lo que representa un 3% de la carga mundial de TB (10 millones de casos) y una tasa de incidencia de 28 por cada 100,000 habitantes. La tasa de incidencia más alta se registró en el caribe (61.2), América del Sur (46.2) América Central y México (25.9) y Norte América (3.3).



Figura 2. Informe mundial sobre la tuberculosis 2018 para la región de las Américas. Tomado y modificado de (OPS, 2018).

Para este mismo año, la OPS estimó que el 87% de los casos de TB se encontraba en 10 países, de los cuales un poco más de la mitad se concentran en Brasil, Perú y México (Tabla 1) (OPS, 2018).

Se estima que alrededor de 1.7 billones de personas, 23% de la población mundial, tienen una infección latente de TB. Estas personas tienen el riesgo de desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida. Las principales intervenciones en el cuidado de la salud para prevenir nuevas infecciones por *Mtb* y su progresión hacia la enfermedad, están enfocadas hacia el tratamiento de la

TB latente y la vacunación de niños con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). La mayoría de los nuevos casos de TB esta relacionados con la desnutrición, la co-infección con el VIH, el tabaquismo, diabetes y el consumo de alcohol. La TB no solo es un problema biomédico y de salud pública, sino también es una enfermedad asociada con la pobreza; la TB continuará mientras la pobreza persista (Kanchar & Swaminathan, 2019).

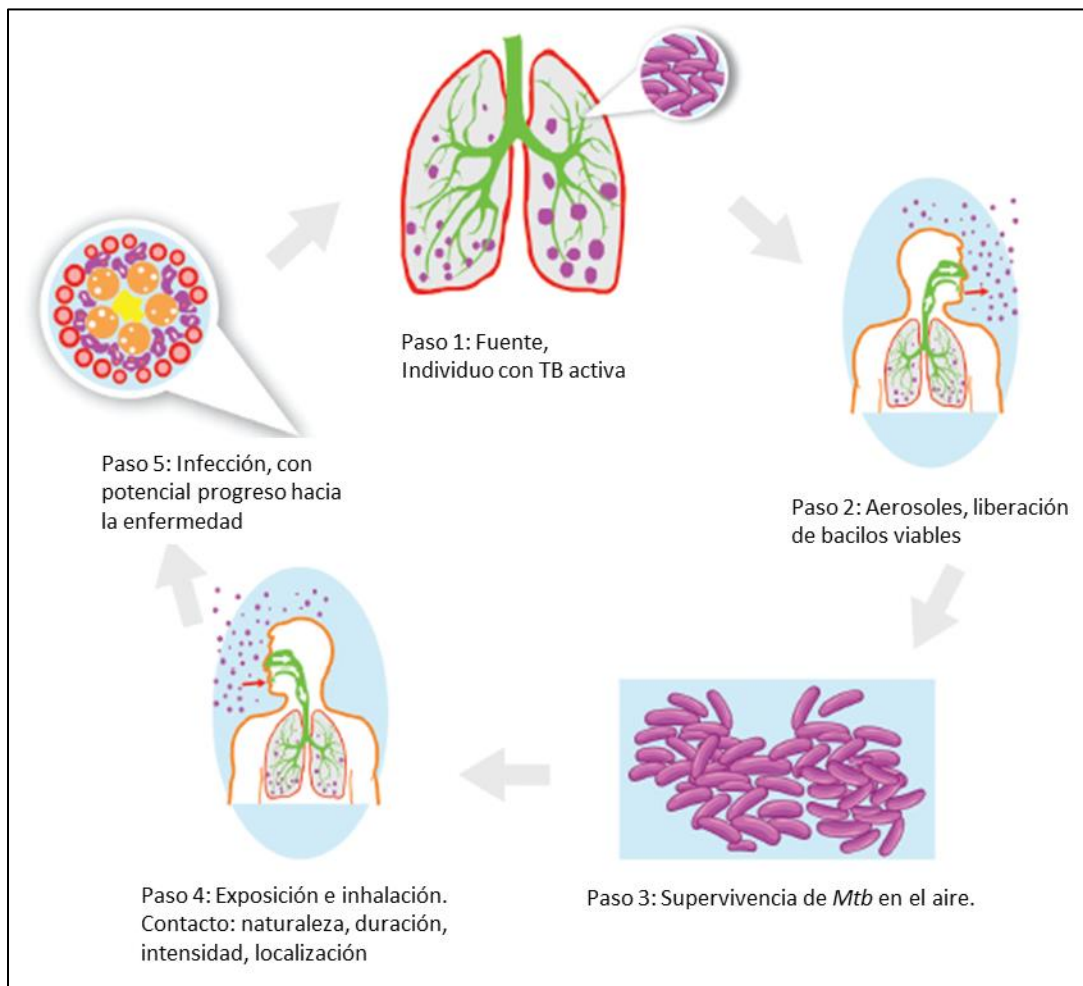
**Tabla 1.** Países con mayor número de casos estimados de TB en las Américas 2017. Tomado y modificado de (OPS, 2018).

N°	PAIS	CASOS ESTIMADOS	% TOTAL	% ACUMULADO
1	Brasil	91,000	32	32
2	Perú	37,000	13	45
2	México	28,000	10	55
4	Haití	20,000	7	62
5	Colombia	16,000	6	68
6	Venezuela	13,000	5	73
7	Argentina	12,000	4	77
8	Bolivia	12,000	4	81
9	Estados Unidos	10,000	4	85
10	Ecuador	7,200	3	87
	Resto de América	35,800	13	100
	Total	282,000	100	100

### 2.3 Transmisión

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) incluye especies estrechamente relacionadas entre las que se encuentran *M. tuberculosis* (Mtb), *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* que son las más frecuentemente asociadas con la enfermedad humana. La principal ruta de infección por *M. bovis* es vía oral cuando se ingieren productos lácteos no pasteurizados provenientes de vacas infectadas, causando la mayoría de los casos de TB extra-pulmonar (Bobadilla *et al.*, 2015). Sin embargo, la principal vía de transmisión de *Mtb* es por vía aérea de persona a persona. Personas con TB pulmonar activa generan aerosoles que contienen al bacilo *Mtb* al toser, cantar, gritar, estornudar o con cualquier otra

maniobra respiratoria y que son inhalados por las personas que están a su alrededor. Una persona con TB activa (TBA) puede infectar al 30% de las personas que mantienen contacto cercano a ella, de las cuales entre el 5% y el 15% desarrollará TBA. Esto genera un ciclo de transmisión en el que existen: i) Individuos con TBA, ii) generación de aerosoles, iii) los bacilos sobreviven en el aire, iv) Exposición e inhalación y v) infección con potencial progreso de la enfermedad (Figura 3) (Churchyard *et al.*, 2017).



**Figura 3. Ciclo de transmisión de la tuberculosis.** Cascada simple para la transmisión de la tuberculosis en la que: (1) un caso fuente de tuberculosis, (2) genera partículas infecciosas, (3) que sobreviven en el aire, (4) son inhaladas por un individuo susceptible (5) que puede infectarse y quién tiene el potencial de desarrollar tuberculosis. Tomado y modificado de Churchyard *et al*, 2017

El desarrollo de la enfermedad depende del establecimiento y proliferación de los bacilos y de la propia respuesta inmune del hospedero. Una vez que *Mtb* llega a los alveolos pulmonares, se desencadenan cuatro escenarios posibles (Arce *et al.*, 2008):

1. La respuesta inmune del hospedero elimina a los bacilos y por lo tanto la enfermedad no se desarrolla
2. El bacilo logra multiplicarse, la respuesta inmune tarda en activarse y provoca una TB primaria
3. El bacilo se establece pero no causa enfermedad activa, alcanzando un “equilibrio” con el hospedero; generándose una infección latente (TBL)
4. La TBL puede reactivarse, los bacilos se multiplican y diseminan provocando una TB activa post-primaria.

La infección por *Mtb* puede resumirse en dos estados clínicamente definidos: una enfermedad activa (TBA) o una infección latente (TBL). La TBA se diagnostica en pacientes que presentan signos y síntomas clínicos de TB, además de que exista evidencia microbiológica. Se caracteriza por la presencia de tos crónica, fiebre, pérdida de peso sostenida y hemoptisis. Por el contrario, la TBL está caracterizada por la ausencia de síntomas clínicos, pero sensibilidad a antígenos micobacterianos (prueba cutánea de la tuberculina o ensayo de liberación de IFN- $\gamma$  (Cadena *et al.*, 2017). La principal manifestación de la TB es la forma pulmonar, sin embargo, otros órganos como los ganglios, riñones, meninges, intestino, etc., también pueden ser infectados.

## **2.4 Respuesta inmune a la tuberculosis**

### **2.4.1 Respuesta inmune innata**

La primer línea de defensa contra *Mtb* es el moco de las vías superiores altas, este contiene diversos efectores solubles como la lisozima, la lactoferrina, las defensinas y las catelicidinas. En las vías respiratorias bajas, *Mtb* se encuentra con las proteínas surfactantes A (SP-A) y D (SP-D) que opsonizan al bacilo. SP-A induce la fagocitosis de *Mtb* por los macrófagos, mientras que SP-D la reduce (Arce *et al.*, 2008).

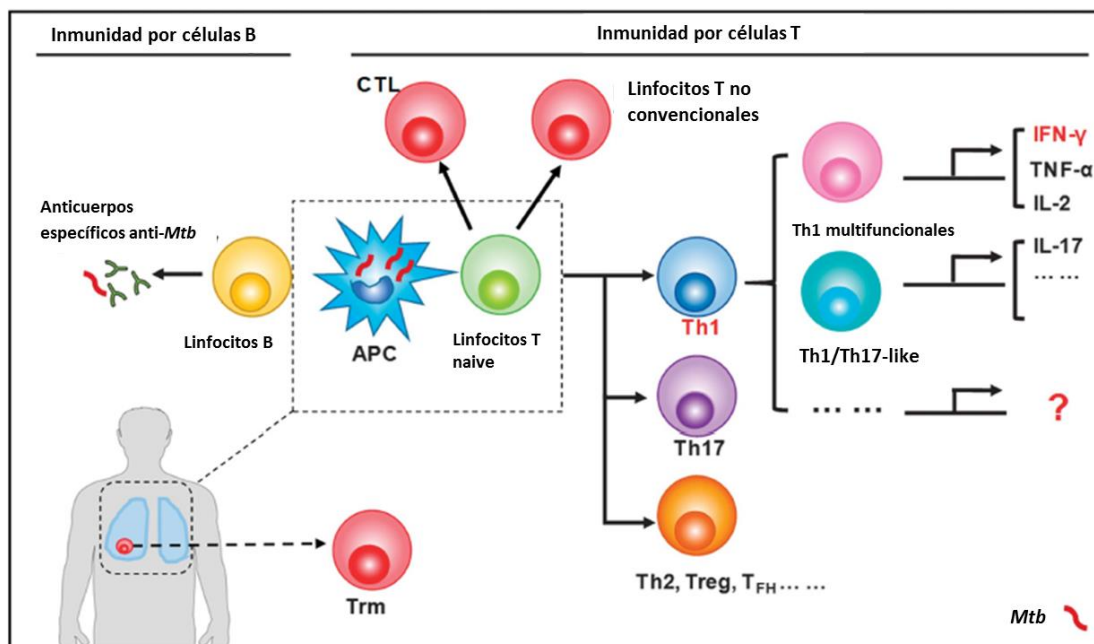
Cuando *Mtb* logra llegar a los alveolos pulmonares, ya sea opsonizado o no, se encuentra con las principales células de la respuesta inmune innata como macrófagos (Mø), las células dendríticas (DC's), los neutrófilos y las células asesinas naturales (NK's). Estas células son capaces de reconocer a *Mtb* a través de varios receptores de patrones de reconocimiento (PRR's), tales como los tipo Toll (TLR), los tipo Nod (NLR), los de lectina tipo C (CLR's), de manosa y receptores para opsoninas. Tras la infección por *Mtb*, la respuesta inmune innata del hospedero organiza múltiples eventos de señalización a través de los PRR's para activar distintas funciones de defensa como la fagocitosis, autofagia, apoptosis, la activación de inflamomas y se desencadena la producción de citocinas y quimiocinas, que en conjunto aumentan la presentación de antígenos, contribuyendo así a la inducción de la inmunidad adaptativa (Liu *et al.*, 2017; Lerner *et al.*, 2015).

#### **2.4.2 Respuesta inmune adaptativa**

Posterior a la exposición a *Mtb*, las células presentadoras de antígeno (APC) procesan los antígenos bacterianos y migran a los nódulos linfáticos donde los presentan a las células T vírgenes, las cuales se activan. Tanto la inmunidad de células B y como la inmunidad de las células T son esenciales para la eliminación exitosa de *Mtb*. (Figura 4) (Zeng *et al.*, 2018).

La respuesta inmune adaptativa contra *Mtb* se establece de 3 a 8 semanas posteriores a la infección, está mediada por linfocitos T y es crítica para el control de la infección. Esta respuesta está dada principalmente por linfocitos T CD4+ antígeno específicos. Estos linfocitos T CD4+ empiezan a producir IFN- $\gamma$ , citocina que incrementa la función microbicida de los Mø. A su vez, los Mø producen IL-1 promoviendo la producción de IL-2 y la expresión de su receptor con la subsecuente expansión clonal de los linfocitos T CD4+. Además de los linfocitos T CD4+ y las células NK, otra fuente importante de IFN- $\gamma$  son los linfocitos T CD8+. Aunque menos estudiados, se han descrito cambios en la función de las células T CD8+ durante la TB activa. Tanto las células T CD8+ antígeno específicas a *Mtb* circulantes como las células T CD8+ ubicadas en sitios de enfermedad, muestran

una actividad citotóxica reducida en comparación con las encontradas en pacientes sanos o con infección latente (Araujo *et al.*, 2008; Jasenosky *et al.*, 2015).

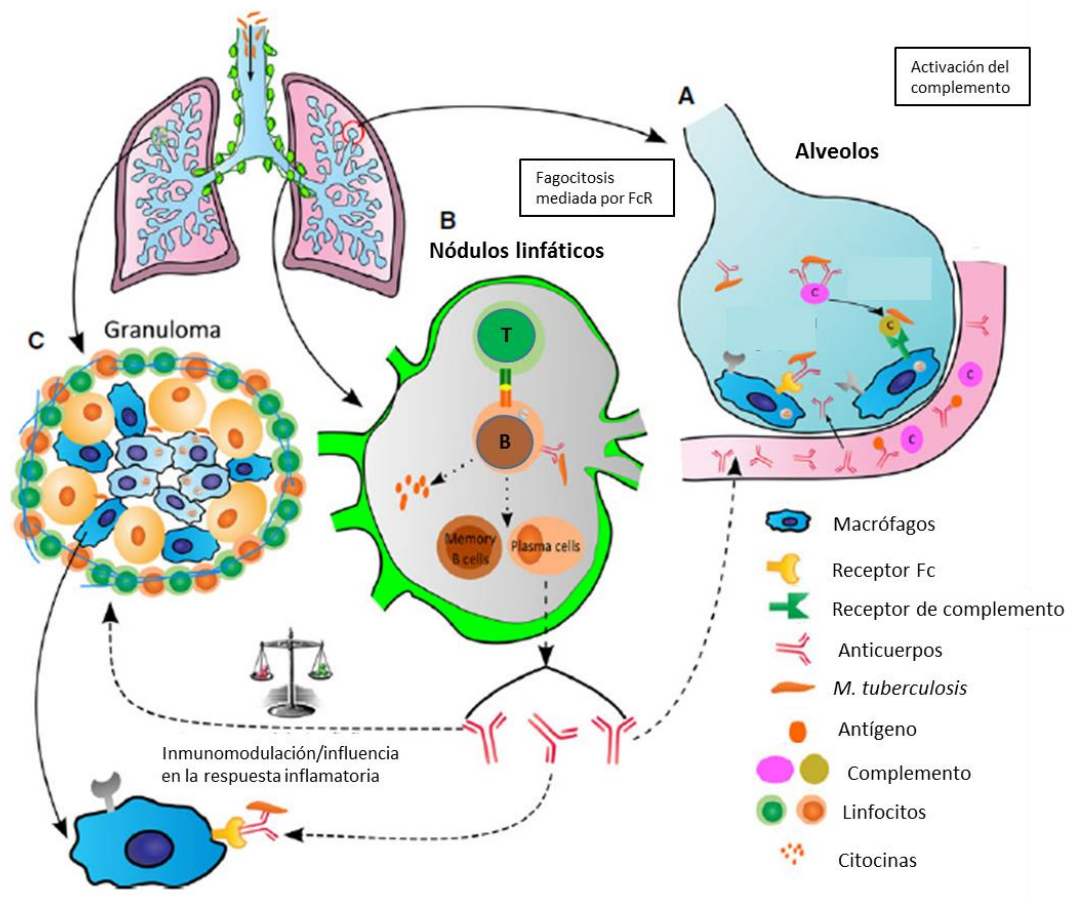


**Figura 4. Inmunidad protectora contra la infección por *Mtb*.** Tras la exposición a *Mtb*, las células presentadoras de antígeno (APC) en los pulmones procesan los antígenos bacterianos y los presentan a las células T naíve, que se activan después del estímulo. La respuesta inmune mediada por linfocitos B está representada por su activación y, posteriormente, la producción elevada de anticuerpos específicos anti-*Mtb*. La inmunidad por linfocitos T está mediada por una variedad de células T, que incluyen CTL, células T no convencionales, Th1, Th17, Th2, Treg,  $T_{FH}$  y otras células. Estudios recientes también enfatizan el papel protector de Trm en la TB. Tomado y modificado de Zeng *et al.*, 2018.

La respuesta mediada por células B está representada por la producción de anticuerpos específicos contra *Mtb*. Sin embargo, en la infección y la enfermedad de *M. tuberculosis*, el papel de la inmunidad humoral aún no está claro. Los anticuerpos (AB), en el espacio alveolar, pueden opsonizar, activar la vía del complemento y facilitar la fagocitosis y muerte de *Mtb* mediante receptores de Fc (FcR). Los linfocitos B ubicados en los nódulos linfáticos desempeñan un papel de defensa a través de: i) Su función como células presentadoras de antígenos y la consecuente activación de los linfocitos B; ii) Producción de citocinas que influyen



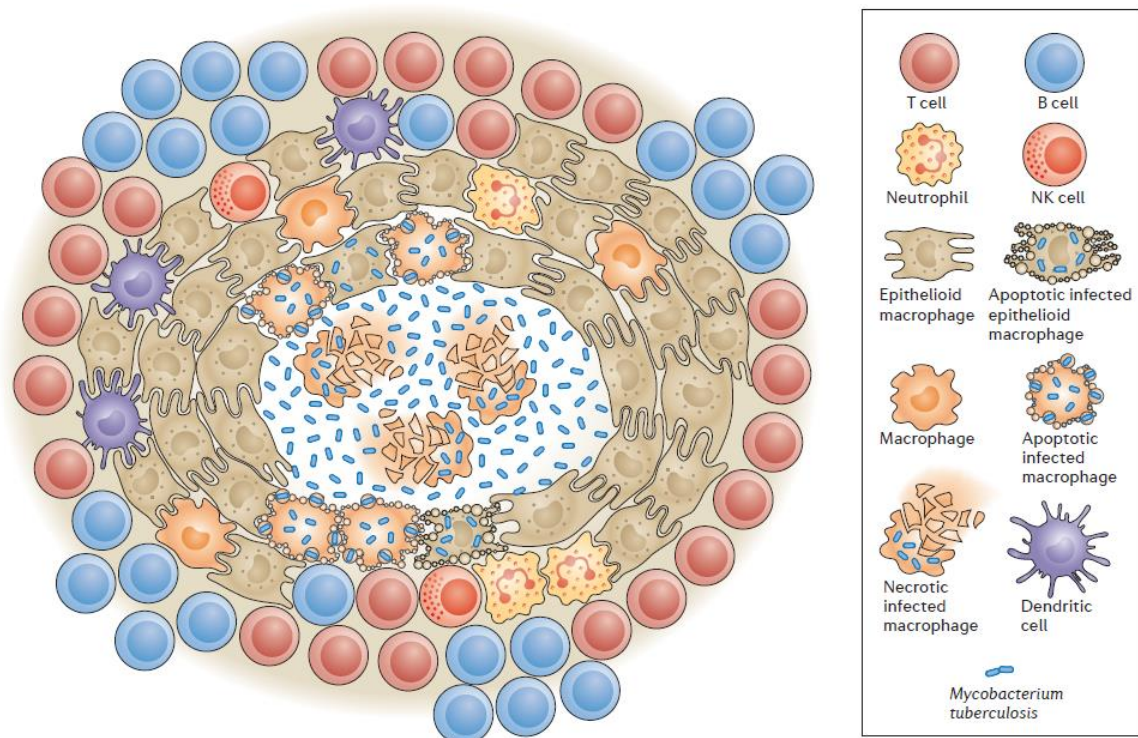
en el desarrollo de la respuesta de las células T cooperadoras (Th); iii) Producción de AB que modulan diversos aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa, además de eliminar antígenos de *Mtb* inmuno-moduladores formando complejos inmunes. Además, los anticuerpos pueden afectar la formación del granuloma a través de sus efectos pro y antiinflamatorios (Figura 5) (Achkar *et al.*, 2015).



**Figura 5. Esquema de la patogénesis de la tuberculosis y los pasos donde los anticuerpos y las células B podrían proporcionar protección contra *Mtb*.** (A) El anticuerpo podría afectar potencialmente el resultado de la infección en el espacio alveolar a través de la opsonización, la activación del complemento y la fagocitosis mediada por FcR. (B) Las células B ubicadas en los nódulos linfáticos podrían desempeñar un papel en la defensa contra la infección a través de diferentes funciones. (C) Influencia de las células B y los anticuerpos sobre la formación de granulomas a través de sus efectos intrínsecos pro y antiinflamatorios. La formación de granulomas mejor organizados en presencia de anticuerpos podría traducirse en una diseminación reducida y un control local de la infección. Tomado y modificado de Achkar *et al.*, 2015.

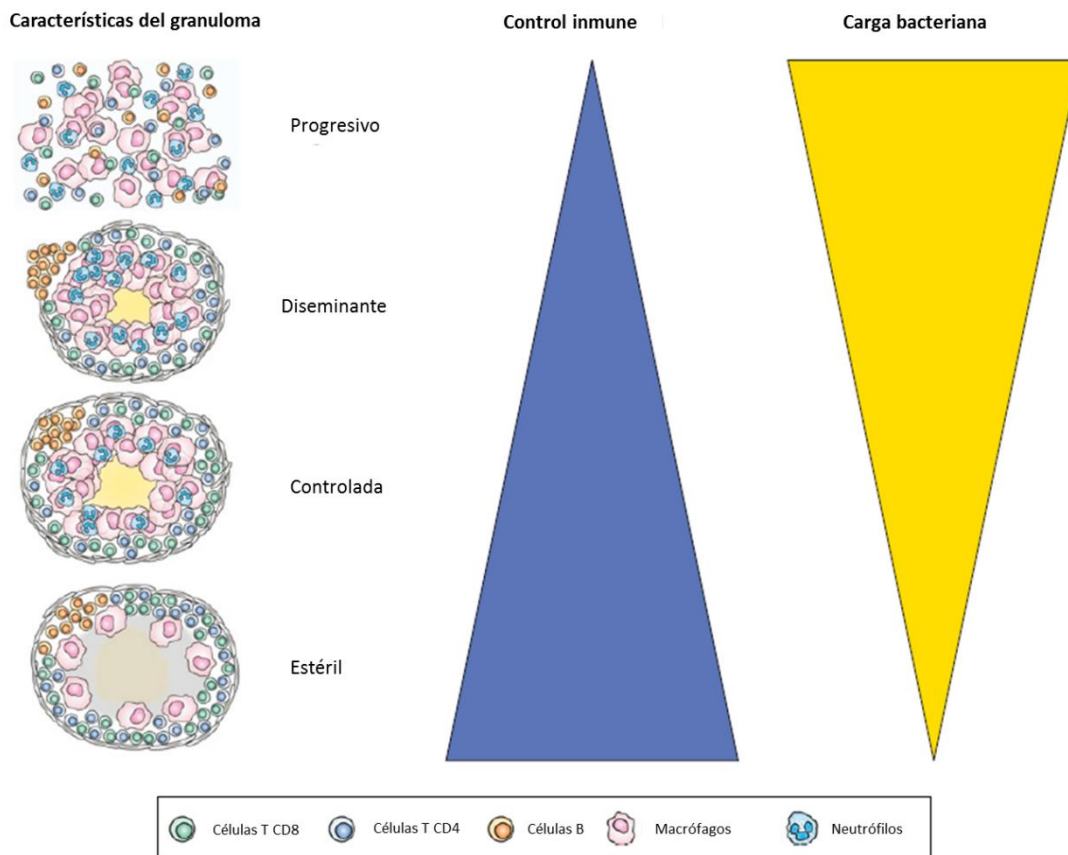
### 2.4.3 El granuloma

El sello patológico característico de la Tb es el granuloma, una estructura organizada esféricamente, compuesta por diferentes tipos de células inmunes, son formados en respuesta a un estímulo persistente en el sitio de infección donde existe un intercambio activo entre *Mtb* y el hospedero. La formación del granuloma es crucial para el control y contención de la infección, pero también puede contribuir a la proliferación y diseminación de *Mtb*. La arquitectura de un granuloma clásico consta de un núcleo necrótico (caseoso), rodeado por una población diversa de Møs en diferentes etapas de activación, rodeados por linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B, también puede contener neutrófilos, DC's, fibroblastos y puede tener un borde fibrótico periférico (Figura 6)(Cadena *et al.*, 2017).



**Figura 6. Granuloma clásico de TB.** El sello distintivo del granuloma de tuberculosis es una colección altamente organizada de células inmunes que se agregan alrededor de un núcleo necrótico. Tomado y modificado de Cadena *et al*, 2017.

Sin embargo existen diferentes tipos de granulomas como los no necróticos, los supurativos, los fibróticos y los calcificados. La función del granuloma es contener y prevenir la diseminación de la infección, proporciona un microambiente inmune donde los Møs se activan para matar o detener el crecimiento de *Mtb*. Sin embargo, la bacteria ha evolucionado para persistir dentro de algunos granulomas, durante años o incluso durante toda la vida del huésped. Cada granuloma representa un microambiente localizado y puede ser influenciado por la respuesta inmune y por la patogenicidad, estado y número de bacterias. Esta heterogeneidad probablemente contribuye al amplio rango de resultados de la infección (Figura 7) (Lin & Flynn, 2018).



**Figura 7. Tipos hipotéticos de granulomas.** Cada tipo de granuloma está asociado con un rango de control inmune y con una carga bacteriana. Un granuloma que ha perdido su estructura y función (progresivos y diseminantes) se asocia con un control inmunológico deficiente y una alta carga bacteriana. En contraste, los granulomas fibróticos son a menudo estériles, lo que refleja una respuesta inmune robusta. Tomado y modificado de Lin & Flynn, 2018.

## 2.5 Vacunación

La intervención más efectiva para el control de enfermedades infecciosas es la vacunación. Ejemplo de esto es la erradicación de la viruela, de la peste bovina y la casi erradicación de la poliomielitis (Fletcher & Schrager, 2016).

La vacuna BCG son bacilos, obtenidos por Calmette y Guérin a partir de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* obtenida después de 231 cultivos sucesivos en un medio de cultivo con glicerina y bilis entre los años 1908 y 1921. La OMS recomienda la vacunación neonatal con la vacuna BCG en los países endémicos con alta tasa de TB (Husain *et al.*, 2016).

Actualmente el BCG es la única vacuna disponible para prevenir la TB pulmonar, desafortunadamente la protección que confiere es variable y limitada (Tanner *et al.*, 2019). Además, la vacuna no es eficaz para prevenir la TB pulmonar en adultos por dos razones principalmente: i) Es incapaz de inducir respuesta inmune celular de larga duración después de la vacunación; ii) La exposición previa a micobacterias ambientales interfiere con la eficacia de la vacuna. Para descubrir una vacuna más eficaz contra la TB y capaz de inducir respuestas inmunitarias de memoria a largo plazo, es necesario tener un conocimiento profundo sobre la patogénesis de la TB y los mecanismos de defensa humanos (Tang *et al.*, 2016).

El desarrollo y la disponibilidad de nuevas vacunas es una parte esencial de la estrategia de la OMS para el fin de la TB. Sin nuevas vacunas eficaces, los objetivos de reducir las muertes por tuberculosis en un 95% y los nuevos casos de tuberculosis en un 90%, entre 2015 y 2035 no se cumplirán (WHO, 2019). Las vías para el desarrollo de la vacuna contra la TB actualmente siguen una de tres estrategias (Hatherill *et al.*, 2016):

- Reemplazar la vacuna BCG con una vacuna más segura y eficaz
- Desarrollar una vacuna que se administre como refuerzo después de la administración de la vacuna BCG
- Desarrollar una vacuna que se administre a personas con TB para que influya en el resultado del tratamiento acortando su duración y/o recurrencia

## 2.6 Tratamiento

El tratamiento antibiótico de la tuberculosis tiene una duración larga y existe una variabilidad significativa de la respuesta inmune del huésped, de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los antifímicos y de las subpoblaciones de *Mtb* en el sitio de la enfermedad (Rockwood *et al.*, 2016).

El uso de una quimioterapia correcta para el tratamiento de la TB activa y de la infección latente es esencial para el control de la enfermedad y para prevenir el desarrollo de resistencia a los medicamentos (PAO, 2009).

El tratamiento estándar recomendado implica la terapia combinada de más de tres fármacos de primera línea: rifampicina (R), isoniazida (I), pirazinamida (Z) y etambutol (E). Otros fármacos utilizados son fluoroquinolonas (moxifloxacino), aminoglucósidos (estreptomina o amikacina). Los esquemas pueden durar de 6 a 9 meses, incluso en TB meníngea la terapia se puede extender durante un año o más (Badel, 2017).

## 2.7 Agente causal

El principal agente causal de la TB es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Este microorganismo se clasifica taxonómicamente dentro del Dominio Bacteria, phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacteriaceae*, Familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*.

El género *Mycobacterium* comprende a más de 170 especies, las cuales son principalmente microorganismos ambientales. Estas especies se han dividido en dos grupos: i) de lento crecimiento y ii) de rápido crecimiento. Las principales especies patógenas para el humano son *Mycobacterium ulcerans* y las incluidas en el *Complejo Mycobacterium tuberculosis (CMtb)*, todas clasificadas dentro del grupo de lento crecimiento. El *CMtb* incluye a las especies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedi*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium dassie* y *Mycobacterium oryx*. De estas, *Mtb* es el miembro más conocido ya que es un

patógeno del sistema respiratorio de mamíferos, que infecta a más de un tercio de la población humana del mundo y es capaz de infectar animales que tienen contacto con humanos (Gagneux, 2018; Velayati & Farnia, 2017).

Son bacilos ligeramente curvos de 1-10  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho, aerobios y no formadores de esporas. En cultivo líquido los bacilos se agrupan en cordones largos dando la apariencia de micelio fúngico, de aquí la etimología griega de este género, “*Myces*” que significa hongo y “*Bakterion*” denotando un bacilo pequeño; la traducción literal sería “bacteria con apariencia de hongo”. Las micobacterias pueden ser cultivadas en el laboratorio en medios de cultivo ricos en iones inorgánicos y suplementados con albúmina para secuestrar ácidos grasos tóxicos, catalasa para eliminar peróxidos, glicerol como fuente de carbono y dextrosa como fuente de energía (Sidders & Stroker, 2007).

### **2.7.1 Genética de *Mtb***

En la actualidad la tecnología de secuenciación de genomas de patógenos ha acelerado la investigación biomédica al proporcionar una comprensión de la diversidad metabólica codificada por un organismo. El enfoque basado en la secuenciación del genoma completo ha sido propuesto para la vigilancia de patógenos bacterianos incluidos en la lista de prioridades de la OMS, la cual incluye especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Neisseria gonorrhoea* y *Mycobacterium tuberculosis* (Cabibbe *et al.*, 2018).

La investigación genómica de la TB se introdujo en el año 1998 con la finalización de toda la secuencia y la anotación del genoma de *Mtb* en el trabajo de Cole y cols (Cole *et al.*, 1998). La información genómica es parte integral del flujo de trabajo de la investigación e impacta todos los aspectos de la investigación de la TB, incluido el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico, el desarrollo de vacunas y la epidemiología. El mayor beneficio de la secuencia del genoma es que proporciona la información fundamental sobre el alcance de la capacidad de codificación (Slayden *et al.*, 2014).

El genoma de *Mtb* H37Rv codifica para aproximadamente 190 reguladores transcripcionales de los cuales, 13 son factores sigma, 11 son sistemas de dos componentes, 11 son proteincinasas y más de 140 son posibles reguladores transcripcionales (Cole *et al.*, 1998). En 2002, el genoma de *M. tuberculosis* fue re-annotado, se incluyeron 82 nuevas secuencias codificadoras de proteínas (CDS) y 22 de ellas con una función precisa. Con esta actualización, fue posible asignar una función a 2,058 proteínas (~52% de las 3,995 proteínas predichas) y solo 376 proteínas supuestas no compartían homología con proteínas conocidas (Slayden *et al.*, 2014).

Además, el genoma de *Mtb* contiene genes que codifican varias proteínas reguladoras que en otras bacterias están involucradas en la regulación de la esporulación y la diferenciación (Cole *et al.*, 1998). Un ejemplo son homólogos de *parA* (*rv1708* y *rv3213c*), involucrados tanto en la segregación cromosómica como en la represión de la esporulación en *Bacillus subtilis* (Sullivan and Maddock, 2000). El genoma de *Mtb* contiene los genes *parA*, *parB* y dos homólogos de *parA*, *Rv1708* y *Rv3213c*. Sin embargo, se desconoce si *parA* y sus homólogos están relacionados funcionalmente (Maloney *et al.*, 2009).

Otro caso interesante son los miembros de la familia Whi. Esta familia de pequeños reguladores transcripcionales es típica de *Streptomyces* y otros actinomicetos. Además, se ha demostrado que los miembros de esta familia están involucrados en la diferenciación, formación de esporas y septación (Soliveri *et al.*, 2000). En el genoma de *Mtb* hay nueve loci *whi*, se cree que las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en la unión al DNA y en la regulación de la transcripción. El importante papel regulador de WhiB en la diferenciación de *Streptomyces* spp. hace que sus homólogos micobacterianos sean candidatos potenciales en la respuesta al estrés o el estado latente de *M. tuberculosis* (Wan *et al.*, 2019).

### **2.7.2 La familia de proteínas del tipo WhiB**

Las proteínas del tipo WhiB (Wbl) se encuentran en todas las actinobacterias. Después de la caracterización inicial de WhiB en *Streptomyces coelicolor*, se han

identificado múltiples parálogos primero en micobacterias (Cole et al., 1998) y después en todo el *phylum*. Las Wbl son pequeñas proteínas (~80-140 residuos) y cada una contiene cuatro residuos de cisteína (Cys) que se unen a un grupo [4Fe-4S]; estas proteínas son sensibles a O<sub>2</sub> y NO, pudiendo tener distintas funciones celulares, además de estar relacionadas con la virulencia, con la resistencia a antibióticos y como reguladores transcripcionales de detección redox implicados en la esporulación y diferenciación en micobacterias y corynebacterias (Bush, 2018). Todos los miembros de esta familia son genes tipo CDS (protein-coding sequence) y están dentro de la categoría funcional 9 que se refiere a proteínas regulatorias.

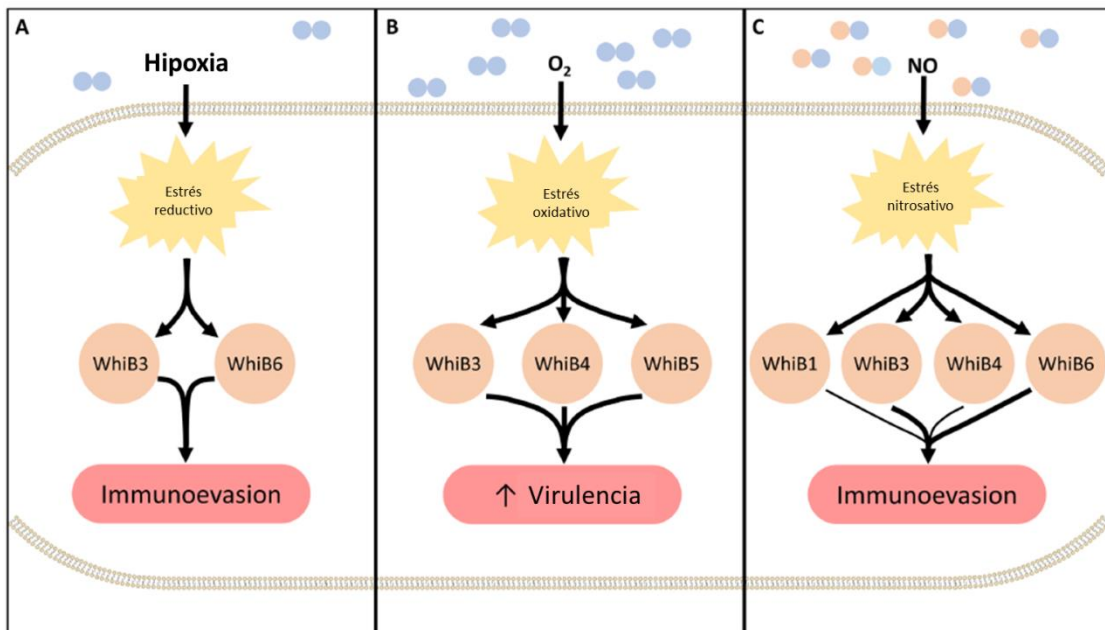
El genoma de *Mtb* codifica 7 proteínas pertenecientes a la familia Wbl: WhiB1 (Rv3219), WhiB2 (Rv3260c), WhiB3 (Rv3416), WhiB4 (Rv3681c), WhiB5 (Rv0022c), WhiB6 (Rv3862c) y WhiB7 (Rv3197A). Están formadas por la unión de 4 hélices-alfa con un “core” [4Fe-4S] (Kudhair et al., 2018). El grupo Fe-S es necesario para la formación de un complejo con el factor sigma A. Se caracterizan por tener residuos conservados de Cys (Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>5</sub>-Cys; donde X es cualquier aminoácido y n es un número variable) que coordinan un grupo Fe-S (Saini et al., 2012). La expresión de estos genes y sus niveles de mRNA varían en la fase media del crecimiento logarítmico, *whiB1* se expresa altamente, mientras que *whiB5* se expresa de manera deficiente en relación a los otros genes *whiB* que se expresan de manera similar con respecto al gen *sigA* (Larsson et al., 2012).

Las proteínas Wbl, a excepción de WhiB2, son proteínas disulfuro reductasa (Alam et al., 2009), lo que sugiere que podrían representar proteínas bifuncionales capaces de unir el DNA para regular la transcripción y para unir objetivos específicos. (Garg et al., 2009). Las funciones de las proteínas WhiB reportadas incluyen: reguladores de la transcripción (todas las proteínas WhiB), mantenimiento de la homeostasis redox (WhiB3, WhiB4 y WhiB7), sistemas de reguladores de secreción de proteínas (WhiB1, WhiB5 y WhiB6), virulencia (WhiB3, WhiB4, WhiB5 y WhiB6), resistencia a antibióticos (WhiB7) y reactivación de latencia



(WhiB1 y WhiB5). La sensibilidad de las proteínas WhiB a factores ambientales dentro del hospedero permite que *Mtb* responda de manera diferencial al estrés durante la infección al modular la expresión de varios factores de virulencia (Figura 8). (Pacl *et al.*, 2018).

De las siete proteínas Wbl de *Mtb*, solo cuatro (WhiB1, WhiB2, WhiB3, WhiB4 y WhiB7) han sido ampliamente estudiadas, de las otras (WhiB5 y WhiB6) se sabe muy poco, excepto por su actividad de proteína disulfuro reductasa (Alam *et al.*, 2009).



**Figura 8. Las proteínas WhiB regulan la virulencia de *Mtb*.** *Mtb* puede encontrar entornos con diversas concentraciones de O<sub>2</sub> y NO dentro del huésped, lo que lleva al desarrollo de tensiones redox intracelulares (amarillo). (A) Bajo condiciones de estrés reductor, WhiB3 y WhiB6 (naranja) adoptan una conformación que promueve la transcripción de genes involucrados en la síntesis de lípidos mientras inhiben la expresión de ESX-1. Estas respuestas mejoran la capacidad de *Mtb* para evadir el sistema inmunitario. (B) Bajo condiciones de estrés oxidativo, WhiB3, WhiB4 y WhiB5 (naranja) contribuyen al aumento de la virulencia (rojo) regulando al alza los genes clave de virulencia, incluidos los sistemas de secreción ESX-2 y ESX-4. (C) Bajo condiciones de estrés nitrosativo, una cantidad de proteínas WhiB (naranja) contribuyen a la transcripción de genes involucrados en la síntesis de lípidos mientras inhiben la expresión de genes ESX-1 y otros procesos involucrados en la evasión del sistema inmune (rojo). Tomado y modificado de Pacl *et al.*, 2018.

WhiB1 es una proteína esencial de unión a DNA, capaz de reprimir su propia unión a la región promotora de su gen estructural (Smith *et al.*, 2010). También se demostró que WhiB1 interactúa con GlgB [enzima ramificadora del alfa (1,4)-

glucano] y reduce un enlace disulfuro intra-molecular presente en esta proteína, lo que sugiere un papel en la regulación postraduccional de GlgB (Garg et al., 2009) (Kudhair *et al.*, 2018).

La proteína WhiB2, también llamada WhmD, es esencial y está involucrada en la división celular. Se demostró que un mutante condicional del gen *whiB2* en *M. smegmatis* produce células filamentosas en condiciones no permisivas (Raghunand and Bishai, 2006a, Raghunand and Bishai, 2006b). Recientemente, se demostró que tanto WhiB2 como un homólogo de WhiB2 codificado por un micobacteriófago se unen al promotor *whiB2* para inhibir su transcripción (Rybniker *et al.*, 2010; Bush, 2018).

WhiB3 fue la primera proteína similar a WhiB de *M. tuberculosis* en caracterizarse, interactúa con SigA, el principal factor sigma (Steyn *et al.*, 2002). Es capaz de responder a las señales de latencia como O<sub>2</sub> y óxido nítrico (NO) a través de su grupo Fe-S (Singh *et al.*, 2009) y representa un sensor redox intracelular capaz de integrar señales ambientales con las rutas metabólicas responsables de la biosíntesis de lípidos complejos tales como poli- y di-aciltrehalosas, sulfolípidos, dimiococerosatos de tiocerol y triacilglicerol. A través de este mecanismo, WhiB3 contribuye al mantenimiento de la homeostasis redox intracelular canalizando equivalentes reductores tóxicos en el anabolismo de lípidos. Además, regula a la baja genes involucrados en la respuesta innata y bloquea la maduración del fagosoma (Singh *et al.*, 2009) (Bush, 2018).

WhiB4 regula la respuesta al estrés oxidativo para modular la virulencia. Un análisis transcripcional identificó genes que son reprimidos por WhiB4 que se expresan diferencialmente bajo diversas condiciones de estrés. La eliminación de *whiB4* conduce a una hiperinducción de antioxidantes, una mayor resistencia al estrés oxidativo in vitro y una mayor supervivencia en los macrófagos, lo que refleja la importancia de WhiB4 para mantener la homeostasis redox. Al igual que los otros miembros de la familia Wbl, WhiB4 contiene un clúster [4Fe-4S] sensible a O<sub>2</sub> y NO. Sin embargo, el grupo [4Fe – 4S] de WhiB4 de *Mtb* parece ser más sensible al O<sub>2</sub> que lo reportado para otros Wbls (Bush, 2018).

WhiB7 controla la resistencia innata a múltiples antifímicos y su gen estructural se induce en su presencia. Su sobreexpresión induce la expresión de genes implicados en la protección ribosomal y el flujo de antibióticos (Morris *et al.*, 2005). Su expresión es inducida por la exposición a concentraciones sub-inhibitorias de antifímicos inhibidores de la traducción como la eritromicina, estreptomina y la tetraciclina. Además de controlar su propia expresión, WhiB7 controla la expresión de gran cantidad de genes de resistencia a antibióticos, por esta razón, la inducción de WhiB7 por un antibiótico específico puede dar lugar a un amplio espectro de resistencia, lo que la convierte en un objetivo potencial para nuevas terapias antituberculosas (Bush, 2018).

### **2.7.3 WhiA**

WhiA es una proteína de unión a DNA (factores de transcripción) de función desconocida conservada entre bacterias Gram-positivas. Se caracterizó por primera vez en *Streptomyces coelicolor*, es esencial para la esporulación y desempeña un papel clave para detener el crecimiento de las hifas aéreas y continuar hacia la septación de la esporulación. La sobre regulación depende de la funcionalidad de sus propios genes, lo que sugiere una autorregulación positiva aunque aún no se sabe si es directa o indirecta. También existen reportes de que WhiA participa en la regulación de la esporulación mediante la regulación de otros genes como son *whiB* o *parB* (Bohorquez *et al.*, 2018).

### **2.7.4 Homólogos de parA (Rv1708 y Rv3213c)**

La segregación de plásmidos y cromosomas esta mediado por las proteínas ParA y ParB. El gen *parA* codifica una proteína con actividad ATPasa y el gen *parB* codifica una proteína que se une al ADN y forma un complejo de nucleoproteína en regiones específicas, llamadas secuencias *parS*, presentes en los plásmidos o los cromosomas cerca del origen de la replicación. El genoma de *Mtb* contiene los genes *parA* (Rv3918), *parB* (Rv3917) y dos homólogos de *parA*, (Rv1708 y Rv3213c) y tanto *parA* como *parB* son esenciales para el crecimiento de *Mtb*. Se desconoce si ParA y sus homólogos están relacionados funcionalmente. Estudios

recientes indican que ParA y sus homólogos se colocan en los polos celulares, sugiriendo su interacción con la separación de los cromosomas replicados, por lo que es probable que desempeñen un papel importante en el ciclo celular (Maloney *et al.*, 2009; Jamenson and Wilkinson, 2017).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos menos explorados tanto en la enfermedad progresiva como en la infección latente, es la expresión y regulación de los genes relacionados con la actividad replicativa de las micobacterias. La investigación de la cinética de expresión de estos genes justifica este proyecto en el sentido de aportar conocimientos fundamentales en la biología de la bacteria in-vivo. Además su eventual caracterización en términos de su importancia en el control del ciclo celular bacteriano permitiría usarlos como blancos para nuevas terapias, sobre todo en el caso de la infección latente.

### 4. OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la expresión los genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*), de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1*, *whiB5*) y evaluar la virulencia e inmunopatología de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* mutante nula para el gen *whiB5*.

#### 4.1 Objetivos particulares

- Cuantificar la expresión de los genes micobacterianos que codifican homólogos de ParA (*Rv1708*, *Rv3213c*) y de la familia Whi (*whiA*, *whiB1*, *whiB5*) en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c y en el modelo de tuberculosis latente con reactivación en ratones C57/Bl/DBA.
- Determinar la inmunopatología y la virulencia de una cepa mutante nula para el gen *whiB5* ( $\Delta$ *whiB5*), una cepa complementada (*CwhiB5*) y la cepa parental *H37Rv* en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c y en el modelo de tuberculosis latente con reactivación en ratones C57/Bl/DBA.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Declaración de Ética

Todos los procedimientos realizados en animales fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" de acuerdo con las directrices de las regulaciones nacionales mexicanas sobre cuidado y experimentación con animales NOM 062-ZOO-1999.

### 5.2 Preparación del inóculo

#### 5.2.1 Cepas utilizadas

Las cepas fueron proporcionadas por el Dr. Ricardo Manganelli del Departamento de Histología, Microbiología y Biotecnología Medica de la Universidad de Padua, Italia (tabla 2). Fueron recibidas en agar solido Middlebrock 7H10 y se siguió el procedimiento estándar para su crecimiento.

**Tabla 2.** Cepas utilizadas en los modelos de tuberculosis progresiva y tuberculosis latente con reactivación.

CEPA	DESCRIPCIÓN
H37Rv	Cepa parental o Wild-type (Wt)
$\Delta$ <i>whiB5</i>	Mutante nula para el gen <i>whiB5</i> . El gen estructural <i>whiB5</i> fue reemplazado por un casete que confiere resistencia higromicina. Sus características cinéticas de crecimiento y morfología colonial son indistinguibles de la cepa parental.
<i>CwhiB5</i>	Cepa mutante complementada. El gen <i>whiB5</i> se reintrodujo en un locus ectópico de su cromosoma.

#### 5.2.2 Cultivo de las micobacterias

El cultivo de las cepas se realizó en caldo BBL Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) con 0.5% de glicerol y 0.05% de Tween 80, el cual se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar y dentro de una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase II (Forma Class, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c) se le adicionó ADC (Albumina, Dextrosa y Catalasa) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) siguiendo las

instrucciones del fabricante. La mezcla final se fraccionó en botellas de cultivo con cuello angulado y tapa con filtro, se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para realizar la prueba de esterilidad.

Una vez confirmada la esterilidad del medio de cultivo, tres botellas se inocularon con las cepas *ΔwhiB5*, *CwhiB5* y H37Rv respectivamente, incubándose durante 21 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se colocaron en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes (medio de cultivo) se eliminaron y se agregaron a cada tubo 20 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) con Tween 80 al 0.05% para resuspender la pastilla o botón celular (micobacterias), a los tubos se les colocó el equivalente a 5 mL de perlas de vidrio estériles de 3 mm de diámetro, los tubos se cerraron y se incubaron en agitación a 120 rpm a 37°C durante toda la noche.

### **5.2.3 Preparación de las cepas**

Al día siguiente, los tubos se agitaron en un vortex (agitador de remolino) durante 10 periodos alternados de 1 min de agitación y 1 min de reposo. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Nuevamente se repitió el proceso de agitación y se centrifugaron a 1500 rpm, 15 min. Al concluir la centrifugación, en la superficie del sobrenadante se formó una capa (nata), la cual se transfirió a un tubo cónico nuevo de 50 mL. Para eliminar el tween 80 se le agregaron 20 mL de PBS, se agitó con vortex hasta homogenizar, se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla formada, nuevamente se le agregaron 20 mL de PBS, se agitó con vortex hasta homogenizar y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla formada se re-suspendió en un volumen final de 5 mL de PBS y se procedió a realizar la cuenta de UFC de micobacterias de la siguiente manera:

- Se preparó una solución madre de diacetato de fluoresceína (DAF), disolviendo 5 mg de DAF en 1 mL de acetona fría; a continuación, se preparó la solución de trabajo tomando una alícuota de 12.5µL de la solución madre y llevándola a 1 mL con PBS.

- Posteriormente, se realizó una mezcla como se indica en la tabla 4 y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y protegido de la luz:

**Tabla 3.** Volumen de las soluciones necesarias para la cuantificación de micobacterias.

Suspensión de micobacterias	1µL
solución de trabajo de DAF	49µL
PBS	50µL
Volumen total	100µL

- Se tomaron 10 µl de la mezcla final se colocaron en una cámara Neubauer, con un microscopio de fluorescencia se realizó el conteo de bacterias verdes fluorescentes y se calculó el número de micobacterias viables utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de bacterias}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. de UFC contadas}}{\text{No. de cuadrantes contados}} \times 0.01 \times \text{dilución}$$

Para la infección pulmonar progresiva, justo antes de la infección intra-traqueal se hizo un ajuste para obtener una concentración de  $2.5 \times 10^5$  UFC/100µL de cada una de las cepas. Para corroborar que los inóculos realmente contenían  $2.5 \times 10^5$  UFC/100 µL, se realizó una titulación de cada uno de ellos (control de calidad). Para cada suspensión, se tomaron 100 µL y se hicieron diluciones seriadas en medio líquido 7H9 hasta la dilución  $10^{-4}$  y se sembraron 10 µL de cada una en medio sólido 7H10 (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD), se incubaron durante 14 a 21 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, después del periodo de incubación se contaron las UFC con la ayuda de una lupa, el resultado esperado fue de 25 UFC en la dilución  $10^{-3}$ .

Para la infección latente/reactivación, las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^3$  UFC/100µL.



### 5.3 Infección intra-traqueal

Los ratones utilizados durante este proyecto fueron proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ.

Para inducir la tuberculosis pulmonar progresiva. Se distribuyeron ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad, en tres grupos de 60 animales. Cada grupo se infectó con cada una de las cepas. Para esto, cada ratón se anestesió con 10 unidades de sevoflurano (sevoflurano, Abbott) utilizando cámara de gases, se les introdujo una cánula intratraqueal calibre 22G x 1" con punta de bola de 1.25 mm para evitar lesionar la tráquea de los ratones (Cadence Science, Cat. 7901) y se inyectaron 100  $\mu$ L de la suspensión de micobacterias ( $2.5 \times 10^5$  micobacterias). Los ratones infectados se almacenaron en cajas con micro-aisladores conectados a un sistema de presión negativa (Allenton, USA), con 10 ratones cada una y se les administró agua y comida "*ad libitum*". Diez ratones de cada grupo se dejaron sin alterar para registrar la supervivencia desde el día 8 hasta el día 120 después de la infección.

Para inducir la tuberculosis latente con reactivación, se utilizaron tres grupos de 50 ratones hembra C57/Bl/DBA de 8 semanas de edad y se infectaron con cada una de las cepas. La metodología de infección fue la misma que para el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, con una dosis infectiva de  $4 \times 10^3$  UFC/100 $\mu$ L.

### 5.4 Sacrificio

Siguiendo la cinética del modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase II, seis ratones de cada grupo al azar se anestesiaron con pentobarbital sódico intraperitoneal a una dosis de 210 mg/Kg y sacrificados por exsanguinación a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. De cada ratón se obtuvieron por separado los pulmones izquierdo, derecho y bazo. De forma aleatoria, cuatro pulmones se perfundieron con etanol y los ocho restantes se colocaron individualmente en criotubos, se cerraron y se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

En la cinética de la tuberculosis latente con reactivación, grupos de 6 ratones se sometieron a eutanasia a los 1, 3 y 5 meses después de la infección. Para inducir

la reactivación, 10 ratones con infección crónica estable a los 5 meses de la infección se trataron con corticosterona (3 mg/L disueltos en agua potable) y se sacrificaron un mes después. De forma aleatoria, cuatro pulmones se perfundieron con etanol y los ocho restantes se colocaron individualmente en crio-tubos, se cerraron y se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

### **5.5 Análisis histológico y morfométrico**

Para cada grupo de ratones en cada uno de los puntos de la cinética de sacrificio en los dos modelos utilizados se tomaron tres pulmones perfundidos en etanol, se seccionaron a través del “*hilus*” y sometieron a tres pases en etanol al 100%, tres pases en xilol y tres pases en parafina, con una duración de 40 min en cada uno de ellos. Posteriormente se fijaron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm de espesor, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se usaron para determinar el porcentaje del área pulmonar afectada por neumonía y el tamaño del área de granuloma (en µm<sup>2</sup>) utilizando un analizador de imágenes automático (Q Win Leica, Milton Keynes).

### **5.6 Cuantificación de unidades formadoras de colonias**

Para cada grupo de ratones en cada uno de los puntos de la cinética de sacrificio en los dos modelos utilizados se tomaron tres pulmones congelados en N<sub>2</sub> líquido. Los pulmones se homogeneizaron con un homogeneizador Polytron (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles de 50 mL que contenían 3 mL de solución salina isotónica. Se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10 de cada homogeneizado y se sembraron 10 µL en placas de agar Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC (Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa). Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 21 días antes de la determinación de UFC.

### **5.7 Extracción de RNA**

Se tomaron los tres pulmones izquierdos obtenidos en cada día de sacrificio y que fueron guardados en nitrógeno líquido. Cada pulmón se trituró en un mortero y N<sub>2</sub> líquido, aproximadamente 5 mg de este tejido se colocó en un tubo de

polipropileno de 1.5 mL y se les agregó 1 mL de TRIzol (Qiagen, Valencia, CA). Se homogenizaron en un sonicador Multi-Gen (Pro Scientific) durante tres ciclos de 30 segundos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a otro tubo e inmediatamente se colocó en hielo. Este sobrenadante contiene el RNA eucarionte, mientras que la pastilla contiene a los bacilos.

#### **5.7.1 Aislamiento de RNA eucarionte**

Para aislar el RNA eucarionte, los sobrenadantes obtenidos en el punto 5.7, se les agregó 250 µL de etanol absoluto, se homogenizaron y se transfirieron a columnas de extracción (RNeasy Mini Kit, Qiagen), estas columnas combinan las propiedades selectivas de unión del RNA a membranas de sílice, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.7.2 Aislamiento de RNA procarionte**

Para aislar el RNA procarionte, las pastillas obtenidas en el punto 5.7 se les agregó 1 mL de TRIzol (Qiagen) y transfirieron a tubos de polipropileno de 2 mL con tapa de rosca a los que previamente se les agregaron el equivalente a 0.1 mL de perlas de zirconio y sílice (1 y 0.1 mm de diámetro, respectivamente). Las micobacterias se lisaron colocando los tubos en el aparato Mini-Bead Beater (Biospec Products Inc.), usando tres ciclos de 30 segundos a 4350 oscilaciones/min. Posteriormente los tubos se centrifugaron durante 1 min a 14,000 rpm, y el sobrenadante fue transferido a un tubo de 2 mL con tapa de rosca conteniendo 300 µL de cloroformo. Después de agitar vigorosamente con el vortex y centrifugar durante 10 minutos 14,000 rpm, la fase acuosa, se transfirió a un tubo nuevo y para precipitar RNA, se le agregaron 10 µL de glicógeno que es un acarreador de ácidos nucleicos y que permite visualizarlos, ½ volumen de acetato de sodio 5 M y 1 volumen de isopropanol, la mezcla se incubó durante 20 min a -20°C. Finalmente, el RNA de la micobacteria se purificó utilizando cuatro ciclos de purificación con columnas (RNeasy Mini Kit, Qiagen), seguidas de una incubación con DNasa para eliminar la posible contaminación con DNA.

## 5.8 Síntesis de cDNA.

### 5.8.1 cDNA eucarionte.

El cDNA eucarionte se obtuvo mediante la transcripción reversa del RNAm con el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania), 500 ng de RNA eucarionte, oligo dT<sub>15</sub> (Promega Corporation Madison WI) y la mezcla de reactivos de la tabla 5, Se realizó un control negativo de reacción, empleando todos los reactivos excepto la enzima omniscrypt RT, para descartar la presencia de DNA.

**Tabla 4.** Mezcla de reactivos para la síntesis de cDNA eucarionte.

BUFFER RT 10X	2 µL
dNTP's (5mM c/u)	2 µL
Oligo dT(10 µM) 1:10	2 µL
Inhibidor de RNasa (10 U/ µl)	1 µL
Omniscrypt RT	1 µL
RNA (500 ng)	Variable
H2O free RNase	Variable
Volumen total	20µL

La mezcla de reacción se colocó en tubos de polipropileno de 0.2 mL y se incubó en un termociclador marca Biorad durante 60 minutos a 37°C. Finalmente los tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso. La concentración del cDNA fue medido por espectrofotometría, leyéndose cada muestra a una longitud de onda de 260 nm.

### 5.8.2 cDNA procarionte

Con el RNA procarionte obtenido, se sintetizó cDNA usando cebadores aleatorios y la enzima MULV-RT (Applied Biosystem), utilizando los volúmenes descritos para cada muestra, en dos fases:

Fase 1:

Cebadores aleatorios (100 MM)	1 µL
dNTP's (10mM c/u)	2 µL
Muestra	500 ng

En esta primera fase se agregó agua libre de RNAsas para completar un volumen de reacción de 20  $\mu$ L. Los tubos con la mezcla se colocaron en un termociclador marca Biorad y se sometieron a un ciclo de desnaturalización a 65°C durante 5 min, posteriormente se colocaron en hielo y se les agregó lo siguiente:

Fase 2.

BUFFER 5X	4 $\mu$ L
DTT 0.1M	2 $\mu$ L
MULV-RT (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
RNase out (10U)	2 $\mu$ L

Esta mezcla final se sometió a un ciclo de síntesis de cDNA durante 60 min a 37°C y a un ciclo final de desnaturalización de la enzima durante 15 min a 70°C en un termociclador. Finalmente el cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración y pureza del cDNA se determinó por espectrofotometría, empleando la correlación de absorbancias 260/280, un espectrofotómetro nanodrop 1000 (thermo fisher scientific).

### **5.9 Integridad del cDNA**

La calidad e integridad del cDNA se verificó mediante la PCR de genes constitutivos. Se utilizó el kit HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, USA) y los cebadores específicos para cada gen, siguiendo los volúmenes indicados en la tabla 6, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguidas por 35 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C o 58°C por 20 s, 72°C por 34 s y una extensión final a 72°C por 10 min. Para el cDNA de RNA eucarionte se utilizaron cebadores para amplificar el fragmento del gen G3PDH y para el cDNA de RNA procarionte cebadores para amplificar el fragmento del gen 16S rRNA.

**Tabla 5.** Volumen de reactivos para la PCR punto final

MIX HOTSTARTAQ	12.5 $\mu$ L
Cebador F 50 pmol/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
Cebador R 50 pmol/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
cDNA (100ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Agua libre de RNAsas	10.5 $\mu$ L
Volumen total	25 $\mu$ L

La formación de un solo producto de PCR y el tamaño esperado del amplicon, 236 pb para G3PDH y 120 pb para 16S rRNA, se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1.8 %, revelados con SYBR Green (Invitrogen) y analizados por densitometría con el equipo Alpha-Innotech Chemilmager 5500 Gel Imaging (Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, United States) y 2  $\mu$ L marcador de peso molecular de DNA de 50 pb (Invitrogen).

#### **5.10 Generación de curvas estándar**

Para cada gen de interés y de manera individual se realizó una PCR. Con el cDNA eucarionte se utilizaron pares de cebadores para los fragmentos de los genes G3PDH, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS e IL-4. Con el cDNA procarionte se utilizaron pares de cebadores para los fragmentos de los genes micobacterianos *rv1708*, *rv3213c*, *whiA*, *whiB*, *whiB5* y *16S*. Para cada producto de PCR se corrió una electroforesis, los productos se revelaron con SYBR Green (Invitrogen) y se analizaron por densitometría con el equipo Alpha-Innotech Chemilmager 5500 Gel Imaging (Cambridge Scientific, Watertown, Massachusetts, United States) y 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular (Invitrogen). La concentración se determinó mediante la comparación de las intensidades de fluorescencia entre los fragmentos y el marcador de peso molecular de concentración conocida. Posteriormente con el número de bases del producto y su concentración en copias por microlitro se elaboró una curva estándar mediante diluciones seriadas para cada uno de los productos de la PCR. Todos los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer Express, el cual fue proporcionado por Applied Biosystem y sintetizados por Invitrogen.

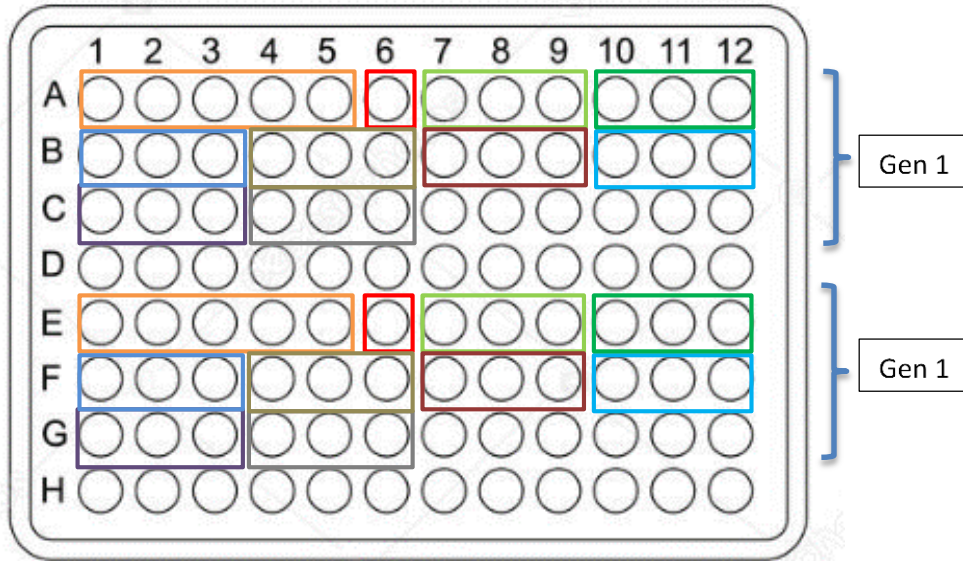
### 5.11 Expresión de genes por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo para cuantificar la expresión de los genes eucariontes G3PDH, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS e IL-4 y de los genes micobacterianos *rv1708*, *rv3213c*, *whiA*, *whiB*, *whiB5* y *16S*. Se utilizó el equipo 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystem) y el kit Quantitect SYBR Green (Qiagen, USA) que contiene Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7, la mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP), SYBR Green I y la enzima HotStarTaq DNA polimerasa. En la tabla 7 se describen los volúmenes de reacción utilizados para cada muestra.

**Tabla 6.** Volumen de reactivos necesarios para la mezcla de reacción en la PCR-RT.

cDNA 100 NG/ $\mu$ L	1.5 $\mu$ L
SYBR Green Mastermix	12.5 $\mu$ L
Cebador F 50 pmol/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
Cebador R 50 pmol/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
Volumen total	15 $\mu$ L

Siguiendo el diseño de la figura 9, se preparó una placa de 96 pozos, para los cebadores con la misma T<sub>m</sub> fue posible analizar dos en la misma placa. La cuantificación de la expresión de los genes se realizó con el cDNA obtenido de cada uno de los tres pulmones de tres ratones diferentes de la cinética del modelo de TB, se incluyó un control negativo y cinco puntos de la curva estándar.



**Figura 9. Diseño de la placa de trabajo para la PCR en tiempo real.** Posiciones A1-A5, E1-E5: diluciones  $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$  de la curva estándar; A6, E6: control negativo; A7-A9, E7-E9: cDNA día 1; A10-A12, E10-E12: cDNA día 3; B1-B3, F1-F3: cDNA día 7; B4-B6, F4-F6: cDNA día 14; B7-B9, F7-F9: cDNA día 21; B10-B12, F10-F12: cDNA día 28; C1-C3, G1-G3: cDNA día 60; C4-C6, G4-G6: cDNA día 120.

La placa se colocó dentro del termociclador y el equipo se programó de la siguiente manera: un ciclo desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 min, 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 20 s para desnaturalización, el alineamiento se realizó dependiendo de la  $T_m$  de cada gen por 20 s,  $72^{\circ}\text{C}$  por 34 s para la elongación.

Con el software 7500 System Sequence Detection (Applied Biosystem), se analizaron los resultados obtenidos en la PCR en tiempo real. Se obtuvieron los valores del número de copias para cada fragmento de gen estudiado con respecto a la curva estándar de concentraciones conocidas que se incluyó en cada experimento. Los resultados de la PCR en tiempo real de los genes de la respuesta inmune del hospedero analizados se normalizaron con respecto a los resultados obtenidos para el gen constitutivo y los genes micobacterianos se normalizaron con respecto al gen 16S, dividiendo  $1 \times 10^6$  entre el número de copias del gen constitutivo y multiplicando el resultado por el número de copias del gen de interés para cada punto de la cinética del modelo de Tb pulmonar progresiva, expresando el resultado de la siguiente manera:

$$\text{No. Copias de gen} / 10^6 \text{ copias de gen constitutivo}$$



### **5.12 Análisis estadístico**

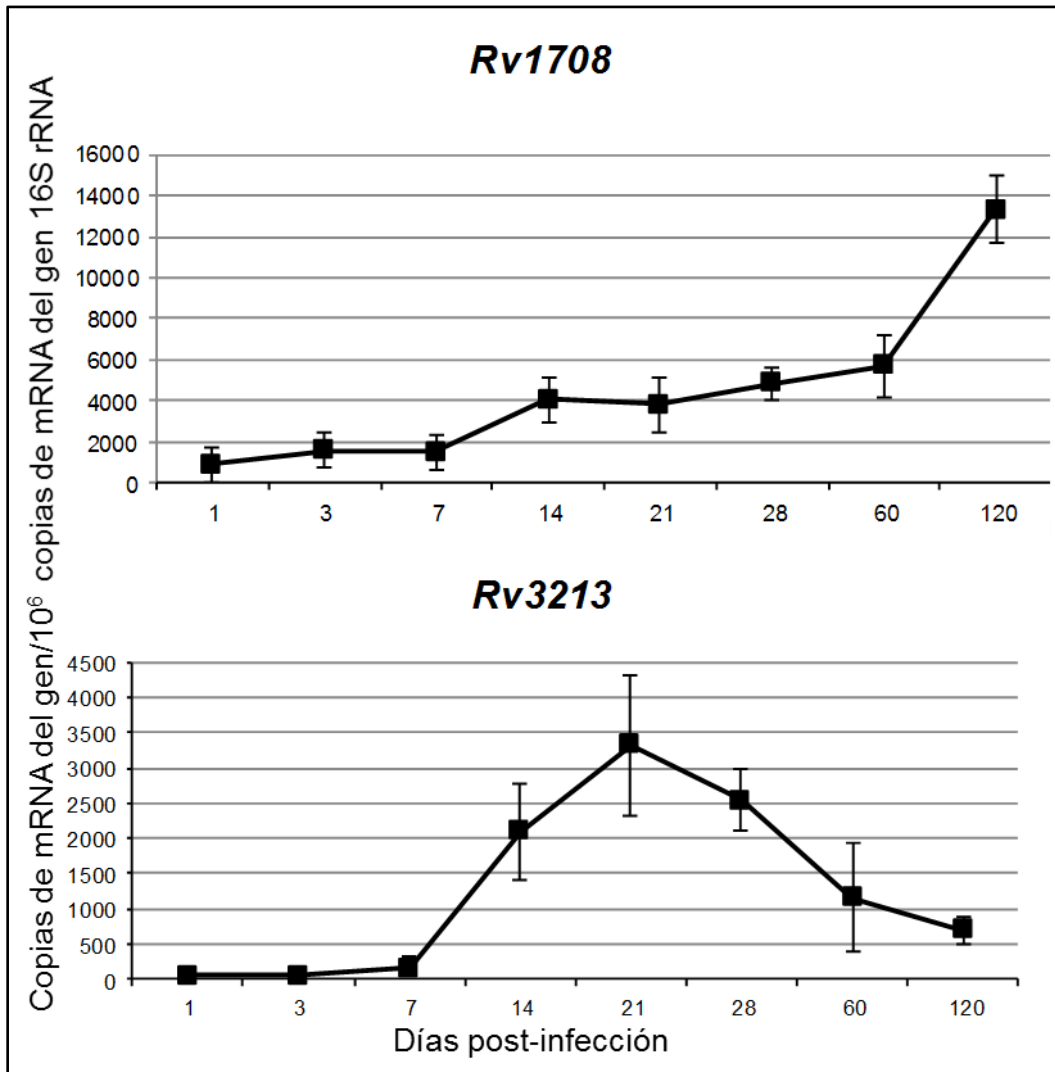
La prueba de Kaplan-Meier se utilizó para el análisis de la curva de supervivencia. Para las curvas de expresión de mRNA se realizó un análisis estadístico tipo ANOVA y una t de Student con los cuales se comparó la expresión entre cada uno de los puntos de la cinética del modelo murino de TB. Las diferencias se consideran significativas cuando  $p < 0.05$ . Los resultados en las gráficas de resultados se presentan como las medias, +/- la desviación estándar. Los asteriscos indican que existe diferencia significativa entre cada uno de los puntos de la cinética del modelo de TB progresiva.

## 6. RESULTADOS

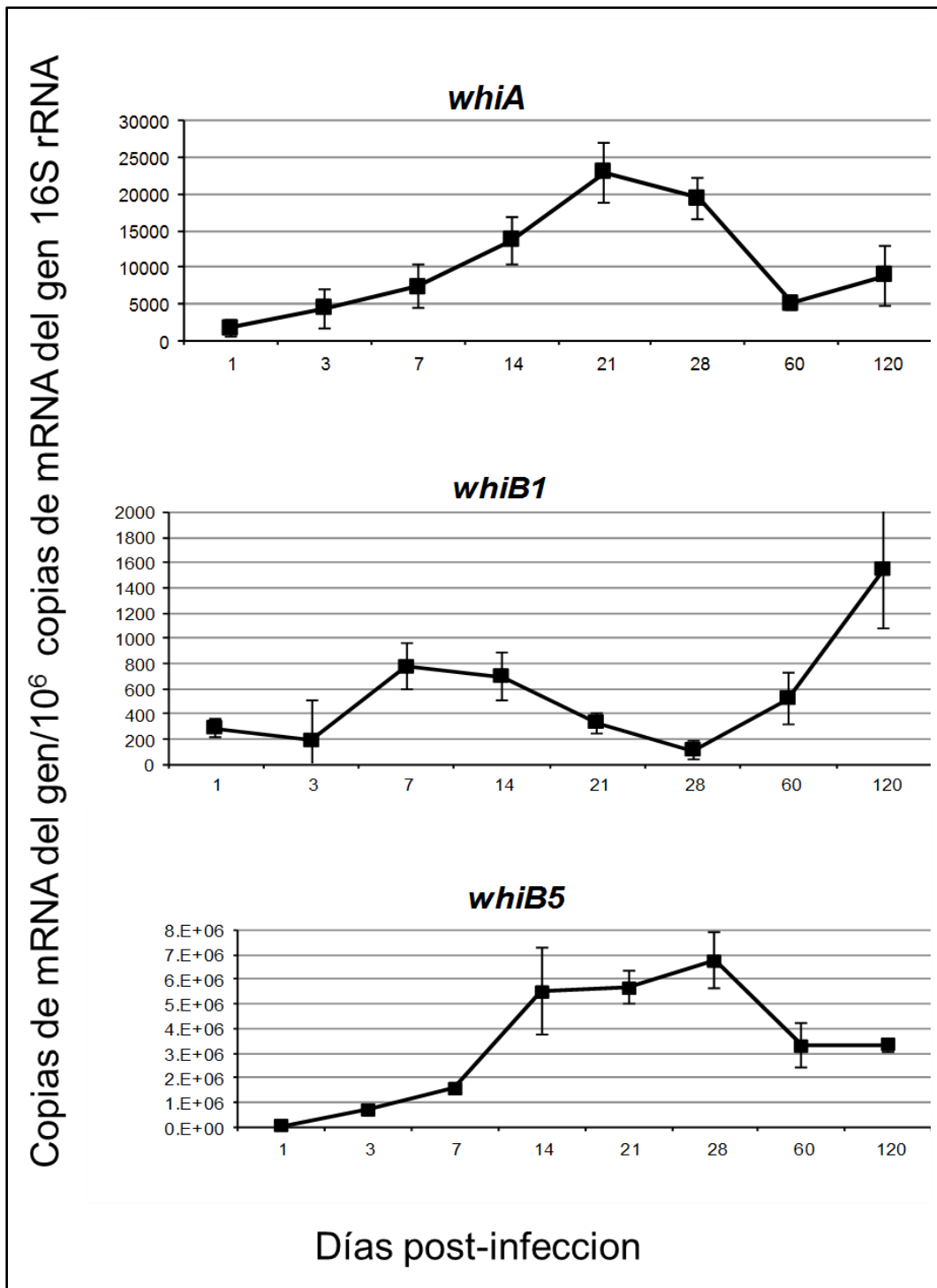
### 6.1 Expresión de genes micobacterianos

#### 6.1.1 En el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.

Para cuantificar la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) (Figura 10) y de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1*, *whiB5*) (Figura 11), a partir del RNA procarionte se realizó la síntesis de cDNA y posteriormente la por PCR en tiempo real para cada uno de los puntos de sacrificio durante la cinética del modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c infectados con la cepa H37RV. Durante la TB progresiva, hay una alta expresión de los genes *Rv3213*, *whiA* y *whiB5* durante los días 14 al 28. De acuerdo a lo descrito por el Dr. Hernández-Pando en 1996 (Hernández-Pando *et al*, 1996), en el modelo de TB progresiva en ratón, esto ocurre cuando la expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se encuentra en sus niveles de expresión más altos; probablemente se deba a que estos genes brindan protección a la micobacteria contra el estrés oxidativo de la respuesta inmune. Por otro lado, los genes *Rv1708* y *whiB1* tienen sus puntos de expresión más altos durante los días 60 al 120. Esto ocurre cuando en el modelo de TB progresiva la inmunidad celular es muy deficiente y por lo tanto, las UFC están en sus niveles más altos, esto sugiere, probablemente que estos genes participen en la septación celular.



**Figura 10. Cuantificación de la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) durante la TB progresiva.** Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para los pulmones de tres ratones Balb/c sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección con la cepa H37Rv.

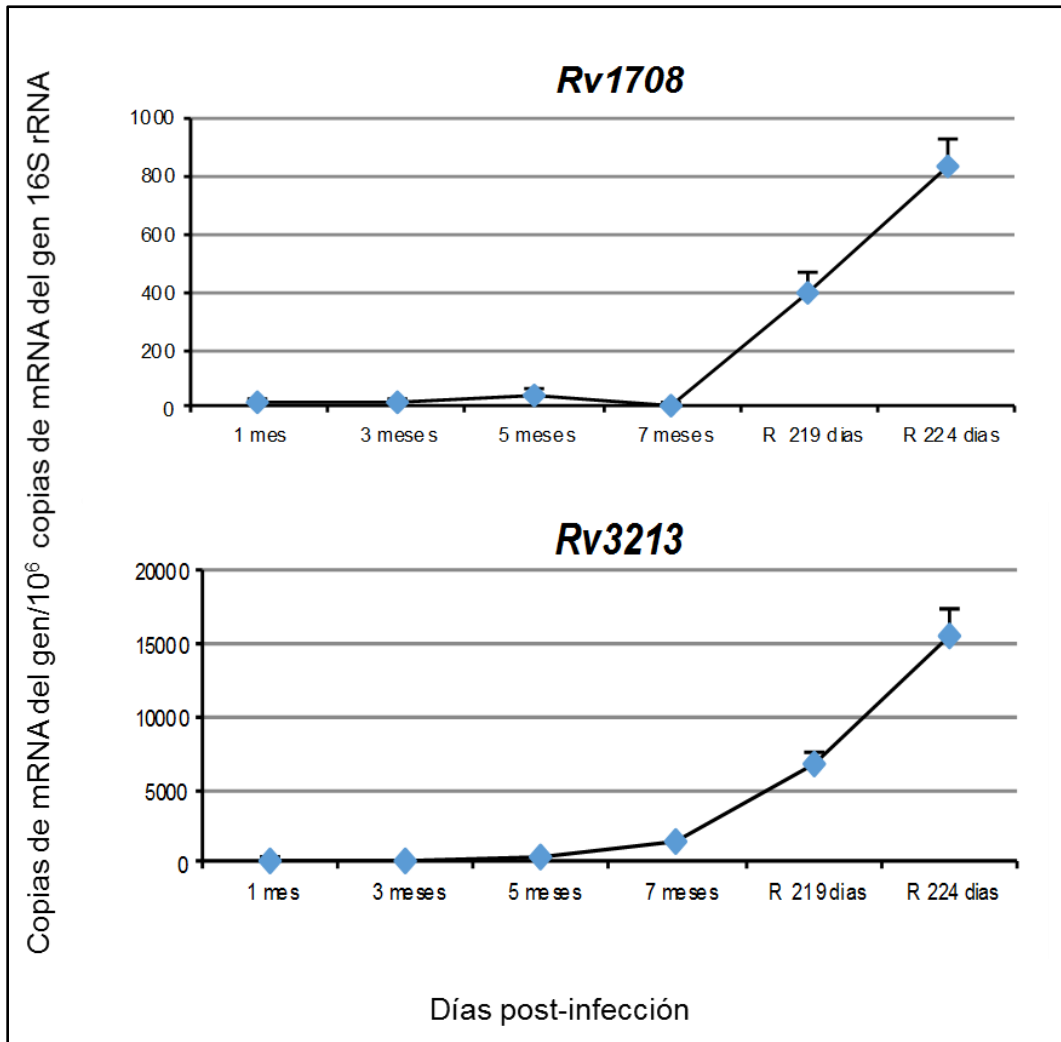


**Figura 11. Cuantificación de la expresión de los genes de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1* y *whiB5*) durante la Tb progresiva.** Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para los pulmones de tres ratones Balb/c sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección con la cepa H37Rv.

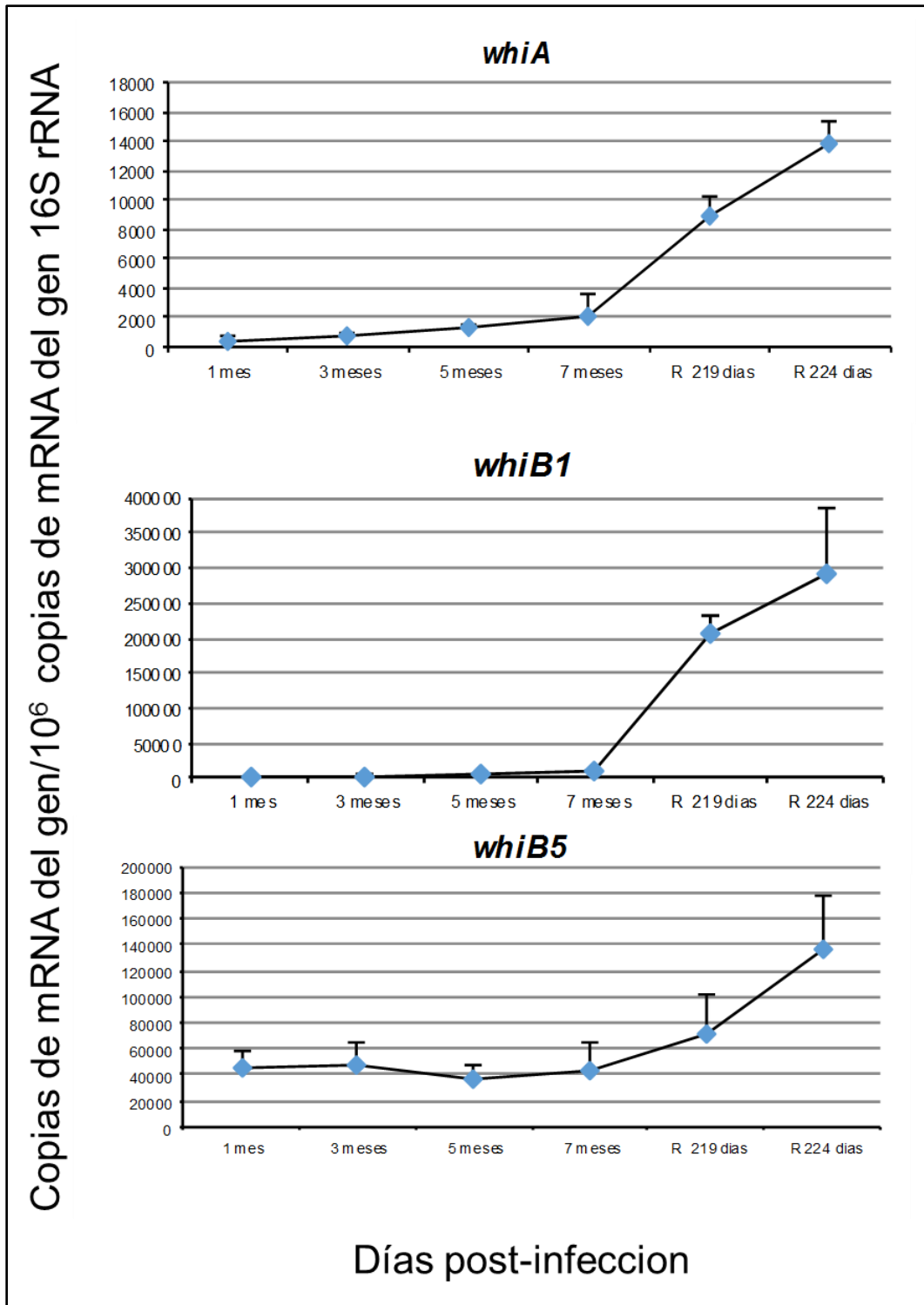
### **6.1.2 En el modelo de tuberculosis latente con reactivación**

Para cuantificar la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) (Figura 12) y de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1*, *whiB5*) (Figura 13), a partir del RNA procarionte, se realizó la síntesis de cDNA y posteriormente la cuantificación por PCR en tiempo real para cada uno de los puntos de sacrificio durante la cinética del modelo de tuberculosis latente/reactivación en ratones C57/Bl/DBA infectados con la cepa H37Rv.

Durante los primeros 7 meses post-infección en el modelo de TB latente, todos los genes mostraron una expresión baja y estable. Exhibiendo un aumento en su expresión durante la reactivación de la enfermedad al administrarle a los ratones corticosterona en su agua de beber para inducir la inmunosupresión y por lo tanto, la reactivación de la enfermedad.



**Figura 12. Cuantificación de la expresión genes homólogos de *parA* (*rv1708*, *rv3213c*) durante la TB latente con reactivación.** Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para los pulmones de tres ratones C57/Bl/DBA sacrificados en cada punto de tiempo después de la infección con la cepa H37Rv.

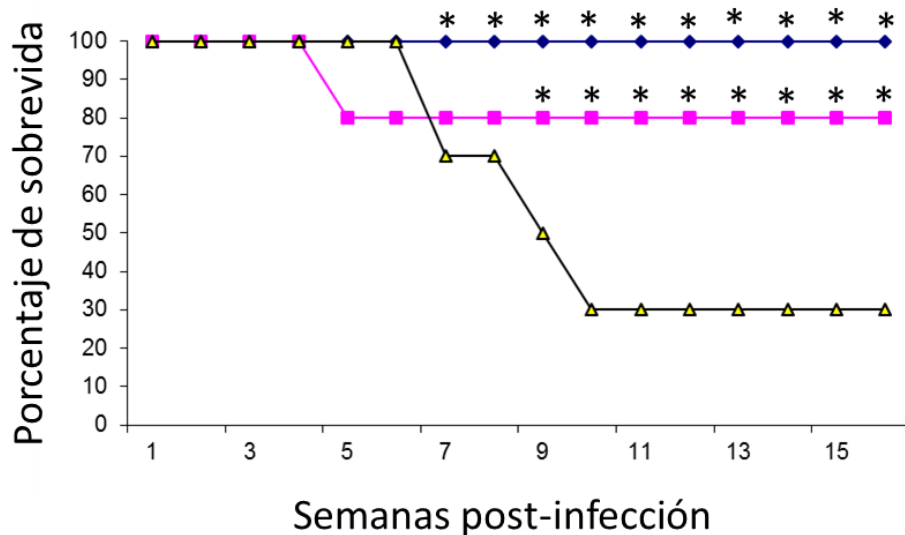


**Figura 13. Cuantificación de la expresión genes de la familia *whi* (*whiA*, *whiB1* y *whiB5*) durante la TB latente con reactivación.** Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para los pulmones de tres ratones C57/BI/DBA sacrificados en cada punto de tiempo después de la infección con la cepa H37Rv.

## 6.2 Inmuno-patogenicidad de la mutante $\Delta whiB5$ durante la tuberculosis experimental progresiva

### 6.2.1 Determinación de sobrevida

Diez ratones de cada uno de los grupos infectados con las cepas *H37Rv*,  $\Delta whiB5$  y *CwhiB5* se dejaron sin molestar hasta el final del experimento (120 días) y se les observó diariamente durante las primeras cuatro semanas post-infección y después semanalmente para registrar la sobrevida (Figura 14). Los grupos de ratones infectados fueron marcados como *H37Rv*,  $\Delta whiB5$  y *CwhiB5*.



**Figura 14. Sobrevida durante la TB progresiva.** En ratones Balb/c infectados con la cepa *H37Rv* (Triángulos amarillos), con la mutante  $\Delta whiB5$  (rombos azules) y con la cepa *CwhiB5* (cuadros rosas). Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con los ratones infectados con *H37Rv*.

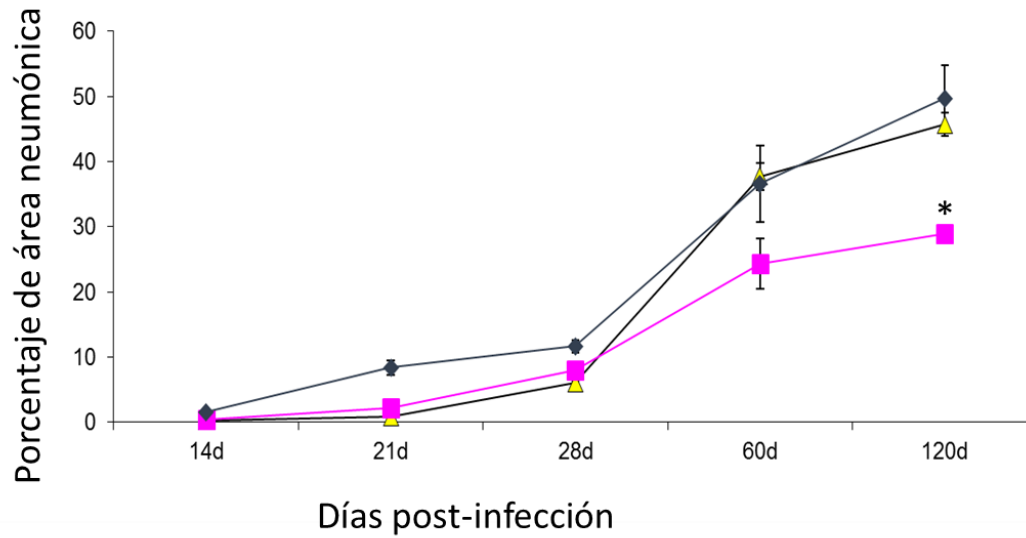
En la gráfica se observa que todos los animales infectados con  $\Delta whiB5$  sobrevivieron, mientras que siete de los inoculados con la cepa parental murieron. Sin embargo, solo 3 de los 10 animales infectados con la cepa *CwhiB5* murieron antes del final del experimento, lo que indica que la complementación de la cepa solo fue parcial; la complementación parcial podría explicarse por la presencia de cantidades menores de la proteína WhiB5. De hecho, de acuerdo a la información proporcionada por Dr. Manganeli, el gen *whiB5* se encuentra cerca del origen de replicación cromosómico en la cepa parental, mientras que en la cepa *CwhiB5* se



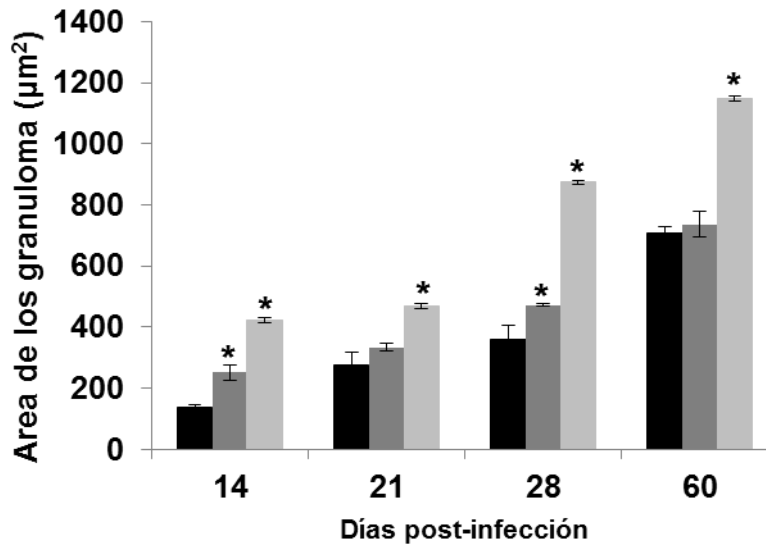
integra lejos de su ubicación cromosómica normal. El análisis estadístico con Kaplan-Meier nos indica que existe una diferencia significativa entre el grupo H37Rv y los grupos  $\Delta whiB5$  y  $CwhiB5$  a partir de la semana 7, mientras que entre los grupos  $\Delta whiB5$  y  $CwhiB5$ , aunque hay diferencia en los porcentajes de sobrevida, estos no son estadísticamente significativos.

### **6.2.2 Análisis histopatológico**

La histopatología se evaluó calculando el % de neumonía (Figuras 15) y midiendo el área de los granulomas ( $\mu\text{m}^2$ ) (Figuras 16) producidos en los pulmones en cada uno de los grupos de ratones. El análisis histopatológico mostró neumonía progresiva después de 28 días de infección con H37Rv, alcanzando su pico en el día 120, cuando el 50% de la superficie pulmonar se vio afectada. Aunque los pulmones de los ratones infectados con  $\Delta whiB5$  mostraron cargas bacterianas significativamente más pequeñas, el porcentaje de consolidación pulmonar en estos animales fue similar al observado para los ratones infectados con la cepa H37Rv. El tamaño de los granulomas, que aparecieron 2 semanas después de la infección, fue aproximadamente 2 veces mayor en los ratones infectados con  $\Delta whiB5$  que en los ratones infectados con la cepa H37Rv o  $CwhiB5$ . Estos datos sugieren que la cepa  $\Delta whiB5$  fue capaz de inducir una fuerte respuesta inflamatoria.



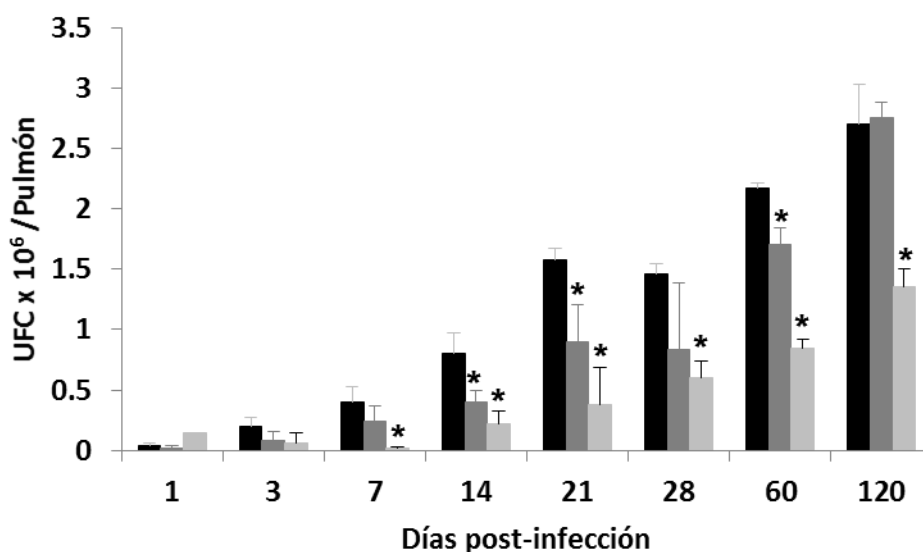
**Figura 15. Gráfica de porcentaje de área neumónica durante la TB progresiva.** En ratones Balb/c infectados con la cepa *H37Rv* (Triángulos amarillos), con la mutante  $\Delta whiB5$  (rombos azules) y con la cepa *CwhiB5* (cuadros rosas). Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con los ratones infectados con *H37Rv*.



**Figura 16. Gráfica de área de los granulomas durante la TB progresiva.** En ratones Balb/c infectados con la cepa *H37Rv* (Barra negra), con la mutante  $\Delta whiB5$  (gris claro) y con la cepa *CwhiB5* (gris oscuro). Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con los ratones infectados con *H37Rv*.

### 6.2.3 Carga bacteriana en los pulmones (UFC´s)

Al analizar la carga bacteriana en los homogenizados de pulmón (Figura 17). Se observa que a partir de la semana uno post-infección existe una pequeña diferencia, estadísticamente significativa, en las cargas bacterianas en los pulmones de los ratones infectados con  $\Delta whiB5$  en comparación con los de los animales infectados con H37Rv o *CwhiB5*. Los ratones infectados con la cepa  $\Delta whiB5$ , mostraron cargas bacterianas significativamente menores, mostrando una clara atenuación, al parecer la falta de WhiB5 produce algunas modificaciones antigénicas que conducen a una mayor inflamación que permite una mejor eliminación de los bacilos

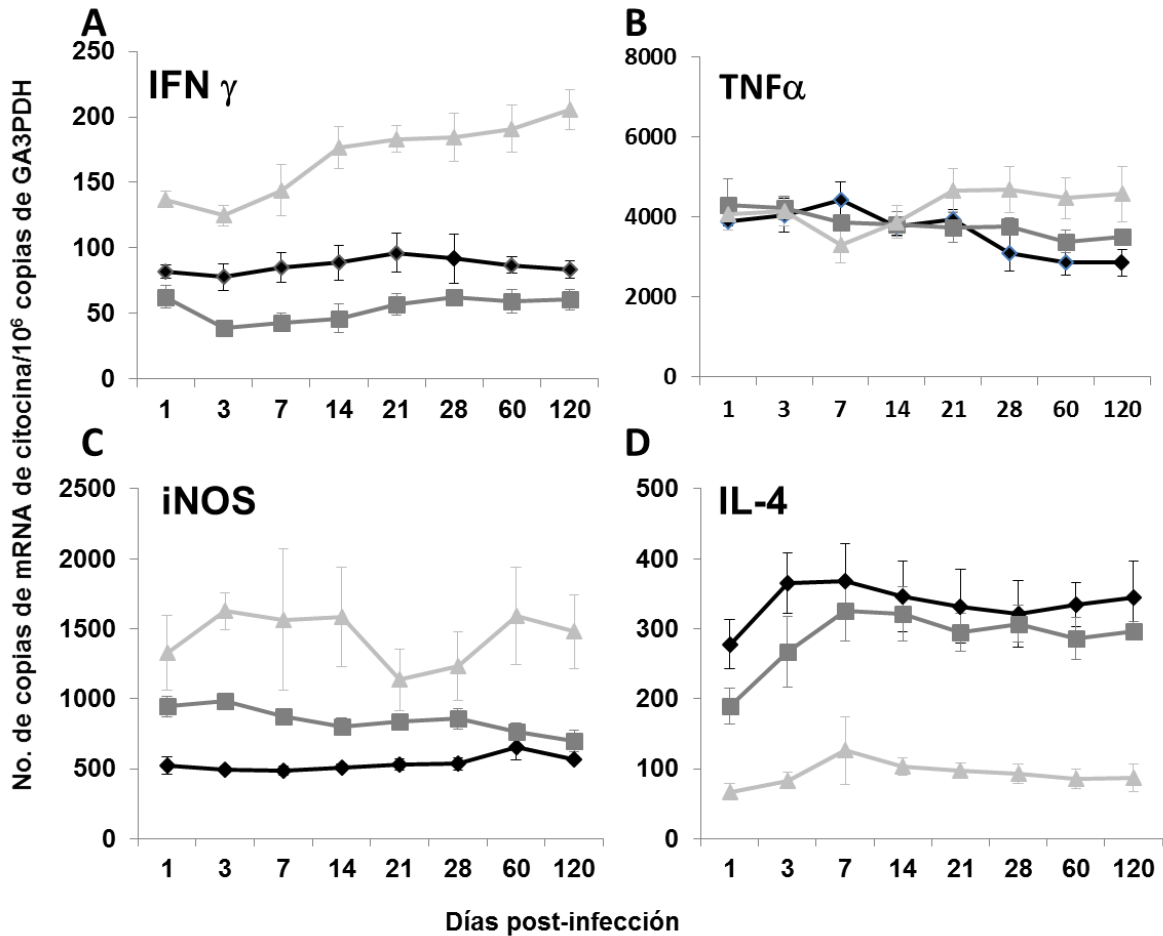


**Figura 17. Grafica de unidades formadoras de colonias durante la TB progresiva.** Se determinaron las cargas bacterianas en pulmones de ratones Balb/c infectados con la cepa H37Rv (Barra negra), con la mutante  $\Delta whiB5$  (gris claro) y con la cepa *CwhiB5* (gris oscuro). Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con los ratones infectados con H37Rv.

### 6.2.4 Cuantificación de la expresión de citocinas

Los datos observados en la figura 18, confirman los resultados histopatológicos. Demuestran niveles de expresión más altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS en los pulmones de ratones infectados con la cepa  $\Delta whiB5$  que en los ratones infectados con la cepa H37Rv o la *CwhiB5*. Sin embargo, la expresión de IL-4 fue menor en

los pulmones de los ratones infectados con la cepa  $\Delta whiB5$ . Estos resultados permiten observar que en el grupo  $\Delta whiB5$  el balance de citocinas es del tipo Th1.



**Figura 18. Expresión cuantitativa de ARNm durante la TB progresiva.** Las cantidades relativas de ARNm para IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), iNOS (C) e IL-4 (D) se determinaron por PCR en tiempo real para pulmones de ratones infectados con H37Rv (rombos negros), con la mutante  $\Delta whiB5$  (triángulos grises claros) y con la cepa CwhiB5 (cuadrados grises oscuros). Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para cuatro animales diferentes en cada punto de tiempo. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en comparación con los ratones infectados con H37Rv.

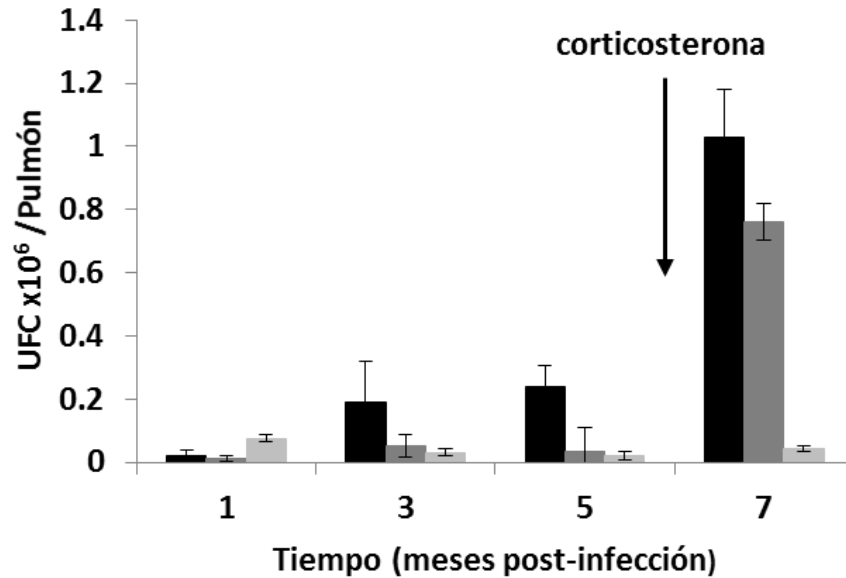
### **6.3 Inmuno-patogenicidad de la mutante $\Delta whiB5$ durante la tuberculosis latente con reactivación**

#### **6.3.1 Determinación de sobrevida**

Como era de esperarse y de acuerdo a lo descrito por Arriaga en 2002 (Arriaga *et al*, 2002) todos los ratones de los tres grupos estudiados (H37Rv,  $\Delta whiB5$  y *CwhiB5*) sobrevivieron durante los primeros 5 meses post-infección. Cuando se trataron con corticosterona para inducir la reactivación de la enfermedad, un mes después de la inmunosupresión, el 10% de los ratones de los grupos H37Rv y *CwhiB5* murieron, mientras que todos los del grupo  $\Delta whiB5$  sobrevivieron, estos resultados no se graficaron.

#### **6.3.2 Carga bacteriana en los pulmones (UFC's)**

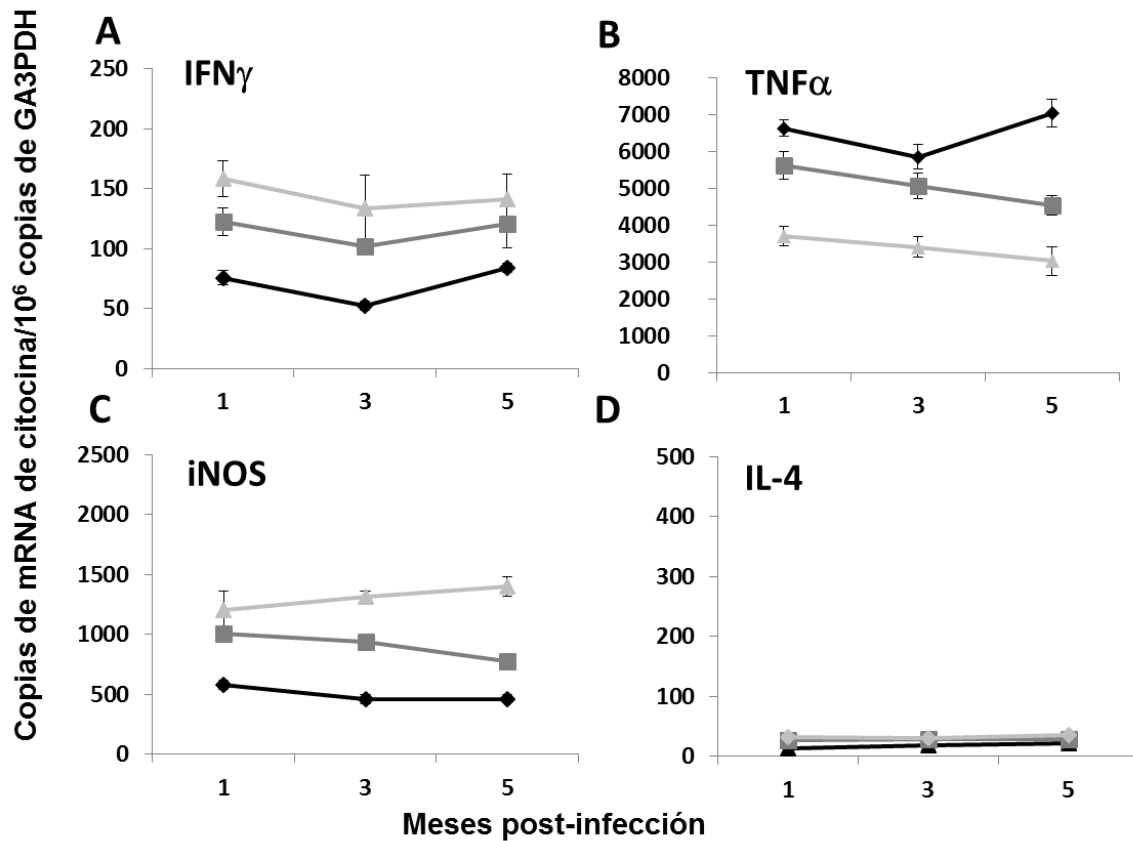
La determinación de las UFC's (Figura 19) nos permite observar que como se esperaba, todos los animales estaban vivos después de 5 meses de infección y tenían cantidades muy pequeñas de bacterias en sus pulmones y aunque no hay diferencia significativa, es posible observar que las UFC's en los pulmones de los ratones del grupo  $\Delta whiB5$  fueron ligeramente inferiores que en los grupos H37Rv o *CwhiB5*. Después de 1 mes de inmunosupresión, los animales infectados con H37Rv o *CwhiB5* mostraron un fuerte aumento en el número de UFC en los pulmones, mientras que la carga bacteriana no cambió significativamente en ratones infectados con  $\Delta whiB5$ , lo que sugiere que estos animales aún podían controlar la infección.



**Figura 19. Patogenicidad de la mutante  $\Delta whiB5$  durante la TB latente con reactivación.** Se determinaron las cargas bacterianas pulmones de ratones C57/Bl/DBA infectados con H37Rv (barras negras), con la mutante  $\Delta whiB5$  (barras gris claro) y con la cepa CwhiB5 (barras gris oscuro). Después de 5 meses de infección, los ratones fueron tratados con corticosterona en su agua de beber para permitir la reactivación de la enfermedad. Los ratones fueron sacrificados a los 1, 3, 5 y 6 meses después de la infección.

### 6.3.3 Cuantificación de la expresión de citocinas

Los ratones infectados con la cepa  $\Delta whiB5$ , mostraron niveles más altos de mRNA de las citocinas Th1 IFN- $\gamma$  e iNOS a excepción de TNF- $\alpha$  (Figura 20). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren la capacidad de los animales para controlar la infección con cualquiera de las tres cepas evaluadas e indican que la proteína WhiB5 contribuye a la reactivación de la infección crónica



**Figura 20. Expresión cuantitativa de ARNm durante la TB latente con reactivación.** Las cantidades relativas de ARNm para IFN-  $\gamma$  (A), TNF-  $\alpha$  (B), iNOS (C) e IL-4 (D) se determinaron por PCR en tiempo real en pulmones de tres ratones C57/Bl/DBA infectados con H37Rv (rombos negros), con la mutante  $\Delta$ whiB5 (triángulos gris claro) y con la cepa CwhiB5 (cuadros gris oscuro). Los datos se expresan como medias y desviaciones estándar para cuatro animales diferentes en cada punto de tiempo.

## 7. Discusión de resultados

Para estudiar el papel fisiológico de WhiB5, se utilizó la técnica de recombinación para reemplazar su gen estructural con un casete que confiere resistencia a la higromicina. La cepa mutante resultante ( $\Delta whiB5$ ) mostró una cinética de crecimiento y una morfología de colonias indistinguibles de las de la cepa parental H37Rv en medio de cultivo Middlebrook 7H9 o 7H10 (datos no mostrados). Posteriormente, la mutante  $\Delta whiB5$  se complementó reintroduciendo el gen *whiB5* con su región reguladora en un locus ectópico de su cromosoma, dando la cepa *CwhiB5*.

Para estudiar el papel de WhiB5 en la patogénesis de la tuberculosis, medimos la expresión de su gen estructural y la respuesta inmune producida en un modelo de TB progresiva en ratones Balb/c y en un modelo de TB latente con reactivación en ratones C57/Bl/DBA. En el modelo de TB progresiva, cuando los ratones se infectan con la cepa H37Rv, la fase inicial está caracterizada por una alta producción de citocinas de células Th1 que, junto con altos niveles de TNF- $\alpha$  e iNOS, controlan temporalmente la infección. Los granulomas se desarrollan durante esta fase, con actividad máxima en el día 21 después de la infección. Cuatro semanas después de la infección, la expresión de citocinas de células Th1, TNF- $\alpha$  e iNOS comienza a disminuir. Gradualmente, las áreas neumónicas prevalecen sobre los granulomas. La neumonía en coexistencia con una gran carga bacteriana provoca la muerte de los ratones (Hernández-Pando *et al*, 1996). El mayor nivel de expresión de *whiB5* se produjo entre los días 14 y 28 de infección, lo que correspondió a la mayor actividad de la inmunidad protectora mediada por las citocinas Th1 y por macrófagos activados. Esto sugiere que la proteína WhiB5 podría estar relacionada con la adaptación bacteriana al entorno de alto estrés producido por el sistema inmune.

La expresión de *whiB5* también se evaluó en el modelo de TB latente con reactivación. Este modelo se caracteriza por cargas bacilares bajas y estables, sin pérdida de peso o muerte de los animales. El estudio histológico e inmunológico en este modelo muestra granulomas, con alta expresión de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e iNOS



(Arriaga *et al*, 2002). Cuando se suministra corticosterona en el agua de beber a los animales infectados, hay un crecimiento bacilar significativo con el desarrollo de consolidación pulmonar, que representa una reactivación real de la infección. A diferencia de la infección latente en humanos, en el modelo murino los bacilos no están en un estado verdaderamente latente porque pueden recuperarse en cultivo axénico. En este modelo, el gen *whiB5* en la cepa H37Rv mostró una expresión baja y estable y exhibió una mayor expresión durante la reactivación.

Para determinar el papel de la proteína WhiB5 en la virulencia, la mutante  $\Delta whiB5$  se usó para infectar ratones en un modelo de TB progresiva en ratones Balb/c y en un modelo de TB latente con reactivación en ratones C57/Bl/DBA. En ambos modelos, la mutante  $\Delta whiB5$  mostró una clara atenuación. En el modelo de enfermedad progresiva, los ratones infectados con la cepa mutante mostraron una supervivencia más larga con cargas bacilares ligeramente más pequeñas que las de los ratones infectados con la cepa parental y la cepa complementada. Además, los ratones infectados con la cepa mutante mostraron una mayor consolidación inflamatoria pulmonar que los infectados con las otras cepas, así como granulomas más grandes y una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en coexistencia con una menor producción de IL-4, lo que sugiere una mayor respuesta inmune protectora en estos animales. Este perfil de citocinas fue confirmado y extendido por morfometría automatizada, que mostró un porcentaje de consolidación neumónica similar entre la cepa  $\Delta whiB5$ , y la cepa parental; el área de los granulomas fue aproximadamente 2 veces mayor en la cepa mutante. Por lo tanto, estos datos sugieren que la falta de WhiB5 produce algunas modificaciones antigénicas que conducen a una mayor inflamación y granulomas más grandes, constituidos esencialmente por células Th1 y macrófagos activados, en coexistencia con un menor número de células Th2 y Treg, que permite una eliminación más eficiente de los bacilos.

La TB latente, inducida por la administración de un menor número de bacilos, dio como resultado cargas más bajas de bacilos en los pulmones de los ratones infectados con la cepa  $\Delta whiB5$ , con mayor expresión de IFN- $\gamma$  e iNOS pero con

una menor expresión de que en ratones infectados con la cepa parental o la *CwhiB5*, como se mostró anteriormente en el modelo de TB progresiva. Sin embargo, la infección con la cepa mutante resultó en una menor expresión de TNF- $\alpha$ , en contraste con el modelo de enfermedad progresiva donde la expresión de esta citocina fue mayor. Esta discrepancia entre los dos modelos de infección puede ser el resultado de la cantidad muy pequeña de bacterias que infectan los pulmones en el modelo de infección latente con reactivación o de los diferentes antecedentes genéticos de los ratones utilizados en estos dos modelos de infección. Curiosamente, cuando la infección crónica se reactivó por la administración de corticosterona, la cepa mutante no pudo reanudar el crecimiento, mientras que la carga bacteriana pulmonar de los ratones infectados con la cepa parental o con la cepa complementada aumentó significativamente, lo que sugiere que *WhiB5* podría estar involucrado con la proliferación bacilar durante la reactivación. Hasta donde sabemos, esta es el primer mutante de *M. tuberculosis* que tiene este fenotipo. Este hallazgo es particularmente interesante porque aún se desconoce el mecanismo de reactivación de *M. tuberculosis*. Es posible que la actividad metabólica reducida de la mutante *whiB5* en condiciones limitantes de nutrientes no permita que las micobacterias reanuden el crecimiento después de que la corticosterona alivie la presión de la respuesta inmune, lo que subraya la importancia del estado nutricional en el establecimiento y mantenimiento de la infección latente. Además, dado que *WhiB5* controla la expresión de dos sistemas de secreción de tipo VII (cuya función fisiológica aún es completamente desconocida), es posible hipotetizar que algunos antígenos exportados por ESX-2 o ESX-4 podrían estar involucrados en la inmunomodulación o en los mecanismos de reactivación. Con base en estos hallazgos, creemos que un análisis adicional del comportamiento y la fisiología del mutante *whiB5* durante la infección crónica podrían ayudar a arrojar algo de luz sobre el mecanismo de reactivación de *M. tuberculosis*.

## 8. CONCLUSIONES

- El gen *whiB5* no es esencial para el óptimo crecimiento de las micobacterias, la cinética de crecimiento en medio de cultivo líquido no mostró diferencias y la morfología de las colonias de las tres cepas utilizadas en medio de cultivo sólido fue indistinguible.
- La cepa mutante que carece del gen *whiB5* presenta una atenuación en su virulencia, al obtener un 100% de sobrevivencia y fue capaz de inducir una fuerte respuesta inflamatoria al favorecer la formación de granulomas y consolidación neumónica de mayor tamaño y un alto porcentaje de citocinas pro-inflamatorias.
- La mutante *whiB5* no pudo recuperar su capacidad de replicación después del período de latencia, lo que sugiere que WhiB5 podría ser involucrado en el mantenimiento de la actividad metabólica de *M. tuberculosis* durante este período de la enfermedad.
- La complementación parcial podría explicarse por la presencia de cantidades menores de la proteína WhiB5 en la cepa complementada con respecto a la cepa parental. De hecho, *whiB5* (*Rv0022c*) se encuentra cerca del origen cromosómico de replicación en la cepa parental, mientras que la cepa *CwhiB5* se complementó reintroduciendo el gen *whiB5* con su región reguladora en un locus ectópico de su cromosoma.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* 2015; 264:167–181. PMID: 25703559. PMCID: PMC4629253. DOI: 10.1111/imr.12276.
2. Alam S, Garg SK, Agrawal P. Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. *FEBS Journal.* 2009; 276:76–93. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06755.x.
3. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández C, Rivas B. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Invest Clin.* 2008; 49(3): 411 – 441.
4. Arce A, Rosas A, Morales P, Solís J. Tuberculosis: mecanismos de defensa, inmunopatogénesis y biomarcadores de susceptibilidad y resistencia. *Ciencia UANL.* 2008; 11(3):279-284.
5. Arriaga AK, Orozco H, Aguilar D, Rook GA, Hernández-Pando R. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2002; 128:229–237. PMID: 11985512. PMCID: PMC1906395 DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01832.x
6. Badel LM. Principales causas de ingreso y mortalidad de los pacientes con diagnóstico de tuberculosis en la unidad de terapia intensiva y/o semi-criticos en el INNCMNSZ (Tesis de especialidad en medicina interna). UNAM. 2017.
7. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzz L2, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017; 58: E9-E12. PMID: 28515626. PMCID: PMC5432783.
8. Bobadilla M, Torres P, Cervera ME, Cervantes A, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A, et al. Trends of *Mycobacterium bovis* isolation and first-

- line anti-tuberculosis drug susceptibility profile: A fifteen-year laboratory-based surveillance. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(9):1-11. PMID: 26421930. PMCID: PMC4589280. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004124.
9. Bohorquez LC, Surdova K, Jonker MJ, Hamoen LW. The conserved DNA binding protein WhiA influences chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2018; 200(8): 1-17. PMID: 29378890. PMCID: PMC5869467. DOI: 10.1128/JB.00633-17
  10. Bush, MJ. The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. Mol Microbiol. 2018; 110(5): 663–676. PMID: 30179278. PMCID: PMC6282962. DOI: 10.1111/mmi.14117
  11. Cabibbe AM, Walker TM, Niemann S, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur Respir J 2018; in press. (<https://doi.org/10.1183/13993003.01163-2018>).
  12. Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. Nature reviews | immunology. 2017; 17: 691-702. PMID: 28736436. PMCID: PMC6247113. DOI: 10.1038/nri.2017.69.
  13. Churchyard G, Kim P, Rustomjee R, Gandhi N, Mathema B, Cardenas V, et al. What we know about tuberculosis transmission: An overview. J Infec Dis. 2017; 216(Suppl 6): S629-S635. PMID: 29112747. PMCID: PMC5791742. DOI: 10.1093/infdis/jix362.
  14. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; 393:537-544. PMID: 9634230. DOI: 10.1038/31159
  15. Dahl JL. Electron microscopy analysis of *Mycobacterium tuberculosis* cell division. FEMS Microbiology Letters. 2004; 240: 15–20. PMID: 15500974. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.004.
  16. Flärdh K and Buttner MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat Rev Microbiol. 2009; 7(1): 36-49. PMID: 19079351. DOI: 10.1038 / nrmicro1968.

17. Fletcher HA and Schrager L. TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016; 110: 212–218. PMID: 27076508. PMCID: PMC4830404. DOI: 10.1093/trstmh/trw016.
18. Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16(4):202-213. PMID: 29456241. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.8.
19. Garg S, Alam MS, Bajpai R, and Agrawal P. Redox biology of *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*: protein-protein interaction between GlgB and WhiB1 involves exchange of thiol-disulfide. *BMC Biochem.* 2009; 10:1: 1-12. PMID: 19121228. PMCID: PMC2631452. DOI: 10.1186/1471-2091-10-1.
20. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005; 1(1):55-61. PMID: 16201017. PMCID: PMC1238740. DOI: 10.1371/journal.ppat.0010005.
21. Hatherill M, Tait D, Mcshane H. Clinical testing of tuberculosis vaccine candidates. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(5):1-18. PMID: 28087924. DOI: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0015-2016.
22. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996; 89: 26-33. PMID: 31591165 PMCID: PMC6921654. DOI: 10.1128/IAI.00496-19.
23. Husain AA, Daginawala HF, Singh L, Kashyap RS. Current perspective in tuberculosis vaccine development for high TB endemic regions. *Tuberculosis (Edinb).* 2016; 98:149-158. PMID: 27156631. DOI: 10.1016/j.tube.2016.03.006.

24. Jameson K, Wilkinson A. Control of initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Genes* (Basel). 2017; 8(22): 1-32. PMID: 28075389. PMCID: PMC5295017. DOI: 10.3390/genes8010022.
25. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Golfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Rev*. 2015; 264: 74–87. PMID: 25703553. DOI: 10.1111/imr.12274.
26. Kanchar A and Swaminathan S. Tuberculosis Control: WHO Perspective and Guidelines. *Indian J Pediatr*. 2019; 1-4. PMID: 31240568. DOI: 1007/s12098-019-02989-2.
27. Kudhair BK, Hounslow AM, Rolfe MD, Rolfe MD, Crack JC, Green J, et al. Structure of a Wbl protein and implications for NO sensing by *M. tuberculosis*. *Nat Commun*. 2017; 8: 1-12. PMID: 29273788. PMCID: PMC5741622. DOI: 10.1038/s41467-017-02418-y.
28. Larsson C, Luna B, Ammerman NC, Maiga M, Agarwal N, Bishai WR. Gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* putative transcription factors *whiB1-7* in redox environments. *PLoS ONE*. 2012; 7(7): e37516. PMID: 22829866. PMCID: PMC3400605. DOI: 10.1371/journal.pone.0037516.
29. Lerner T, Borel S, Gutierrez MG. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol*. 2015; 17(9): 1277–1285. PMID: 26135005. PMCID: PMC4832344. DOI: 10.1111/cmi.12480
30. Lin PL, Flynn JA. The end of the binary era: Revisiting the spectrum of tuberculosis. *J Immunol*. 2018; 201:2541-2548. PMID: 30348659. PMCID: PMC6217958. DOI: 10.4049/jimmunol.1800993.
31. Liu CH, Liu H, Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense Vs pathogen evasion. *Cell Mol Immunol*. 2017; 14: 963–975. PMID: 28890547. PMCID: PMC5719146. DOI: 10.1038/cmi.2017.88.
32. Maloney E, Madiraju M, Rajagopalan M. Overproduction and localization of *Mycobacterium tuberculosis* ParA and ParB proteins. *Tuberculosis* (Edinb). 2009; 89(1): S65–S69. PMID: 20006309. PMCID: PMC3226068. DOI: 10.1016/S1472-9792(09)70015-0.

33. Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Thompson CJ, et al. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(34): 12200–12205. PMID: 16103351. PMCID: PMC1186028. DOI: 10.1073/pnas.0505446102.
34. Murray JF. A Century of Tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2004; 169: 1181-1186. PubMed: 15161611. doi.org/10.1164/rccm.200402-140OE.
35. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Tuberculosis en las Américas 2018. Washington, D.C. Disponible en: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49510/OPSCDE1803\\_6\\_spa?sequence=2&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49510/OPSCDE1803_6_spa?sequence=2&isAllowed=y).
36. Pacl HT, Reddy VP, Saini V, Chinta KC, Steyn AJC. Host-pathogen redox dynamics modulate *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Pathog Dis. 2018; 76(5): 1-14. PMID: 29873719. PMCID: PMC5989597. DOI: 10.1093/femspd/fty036.
37. Raghunand TR, Bishai WR. Mapping essential domains of *Mycobacterium smegmatis* WhmD: Insights into WhiB structure and function. J Bacteriol. 2006; 188 (19): 6966–6976. PMID: 16980499. PMCID: PMC1595512. DOI: 10.1128/JB.00384-06.
38. Raghunand TR, Bishai WR. *Mycobacterium smegmatis* whmD and its homologue *Mycobacterium tuberculosis* whiB2 are functionally equivalent. Microbiology. 2006; 152: 2735–2747. PMID: 16946268. DOI: 10.1099/mic.0.28911-0.
39. Rhen M, Eriksson S, Clements M, Bergström S and Normark SJ. The basis of persistent bacterial infections. Trends Microbiol. 2003; 11(2): 80-86. PMID: 12598130. DOI: 10.1016/s0966-842x(02)00038-0.
40. Rockwood N, du Bruyn E, Morris T, Wilkinson RJ. Assessment of treatment response in tuberculosis. Expert Rev Respir Med. 2016; 10(6): 643-654. PMID: 27030924. PMCID: PMC4949330. DOI: 10.1586/17476348.2016.1166960.



41. Rybniker J, Nowag A, van Gumpel E, Nissen N, Robinson N, Plum G, Hartmann P. Insights into the function of the WhiB-like protein of mycobacteriophage TM4 – a transcriptional inhibitor of WhiB2. *Mol Microbiol.* 2010; 77(3): 642–657. PMID: 20545868. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07235.x.
42. Saini V, Farhana A, Steyn AJ. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3: A novel iron–sulfur cluster protein that regulates redox homeostasis and virulence. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 16(7): 687-697. PMID: 22010944. PMCID: PMC3277930. DOI: 10.1089/ars.2011.4341.
43. Sidders B, Stroker NG. *Mycobacteria: Biology.* Encyclopedia of life sciences. 2007. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020389.
44. Singh A, Crossman DK, Mai D, Guidry L, Voskuil MI, Renfrow MB, Steyn AJ. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 maintains redox homeostasis by regulating virulence lipid anabolism to modulate macrophage response. *PLoS Pathog.* 2009; 5(8): e1000545. PMID: 19680450. PMCID: PMC2718811. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000545.
45. Slayden RA, Jackson M, Zucker J, Ramirez MV, Boshoff H, Lew JM, et al. Updating and curating metabolic pathways of TB. *Tuberculosis (Edinb).* 2013; 93(1): 47–59. PMID: 23375378. PMCID: PMC4121119. DOI: 10.1016/j.tube.2012.11.001.
46. Smith LJ, Stapleton MR, Fullstone GJ, Crack JC, Thomson AJ, Green J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1 is an essential DNA-binding protein with a nitric oxide-sensitive iron–sulfur cluster. *Biochem J.* 2010; 432(3): 417–427. PMID: 20929442. PMCID: PMC2992795. DOI: 10.1042/BJ20101440.
47. Soliveri JA, Gomez J, Bishai WR and Chater KF. Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology.* 2000; 146: 333–343. PMID: 10708372. DOI: 10.1099/00221287-146-2-333.

48. Southeastern National Tuberculosis Center, 2010: Guía de información de medicamentos antituberculosos, Edición en español. <https://sntc.medicine.ufl.edu/files/products/DrugInfo/druginfobook.pdf>.
49. Steyn A, Collins D, Jacobs W, Kawakami P, Bloom B. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(5): 3147-3152. PMID: 11880648. PMCID: PMC122487. DOI: 10.1073/pnas.052705399
50. Sullivan SM, Maddock JR. Bacterial sporulation: Pole-to-pole protein oscillation. Curr Biol. 2000; 10(4):159–161. PMID: 10704403. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00331-6.
51. Tang J, Yam WC, Chen Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. Tuberculosis (Edinb). 2016; 98: 30-41. PMID: 27156616. DOI: 10.1016/j.tube.2016.02.005.
52. Tanner R, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, McShane H. The humoral immune response to BCG vaccination. Front Immunol. 2019; 10:1-18. PMID: 31244856. PMCID: PMC6579862. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01317.
53. Velayati AA, Farnia P. The species concept. Atlas of *Mycobacterium tuberculosis*. Academic Press. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803808-6.00001-3>
54. Zeng G, Zhang G, Chen X. Th1 cytokines, true functional signatures for protective immunity against TB? Cell Mol Immunol. 2018; 15(3): 206–215. PMID: 29151578. PMCID: PMC5843617. DOI: 10.1038/cmi.2017.113.
55. Wan T, Li S, Beltran DG, Schacht A, Zhang L, Becker F, Zhang LM. Structural basis of non-canonical transcriptional regulation by the  $\sigma^A$ -bound iron-sulfur protein WhiB1 in *M. tuberculosis*. Nucleic Acids Research, 2020; 48(2): 501–516. DOI: 10.1093/nar/gkz1133.
56. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2018. Geneva. Disponible en: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)

57. Zhang H, Schumacher MA. Structures of partition protein ParA with nonspecific DNA and ParB effector reveal molecular insights into principles governing Walker-box DNA segregation. *Genes Dev.* 2017; 31(5):481-492. DOI: 10.1101/gad.296319.117.